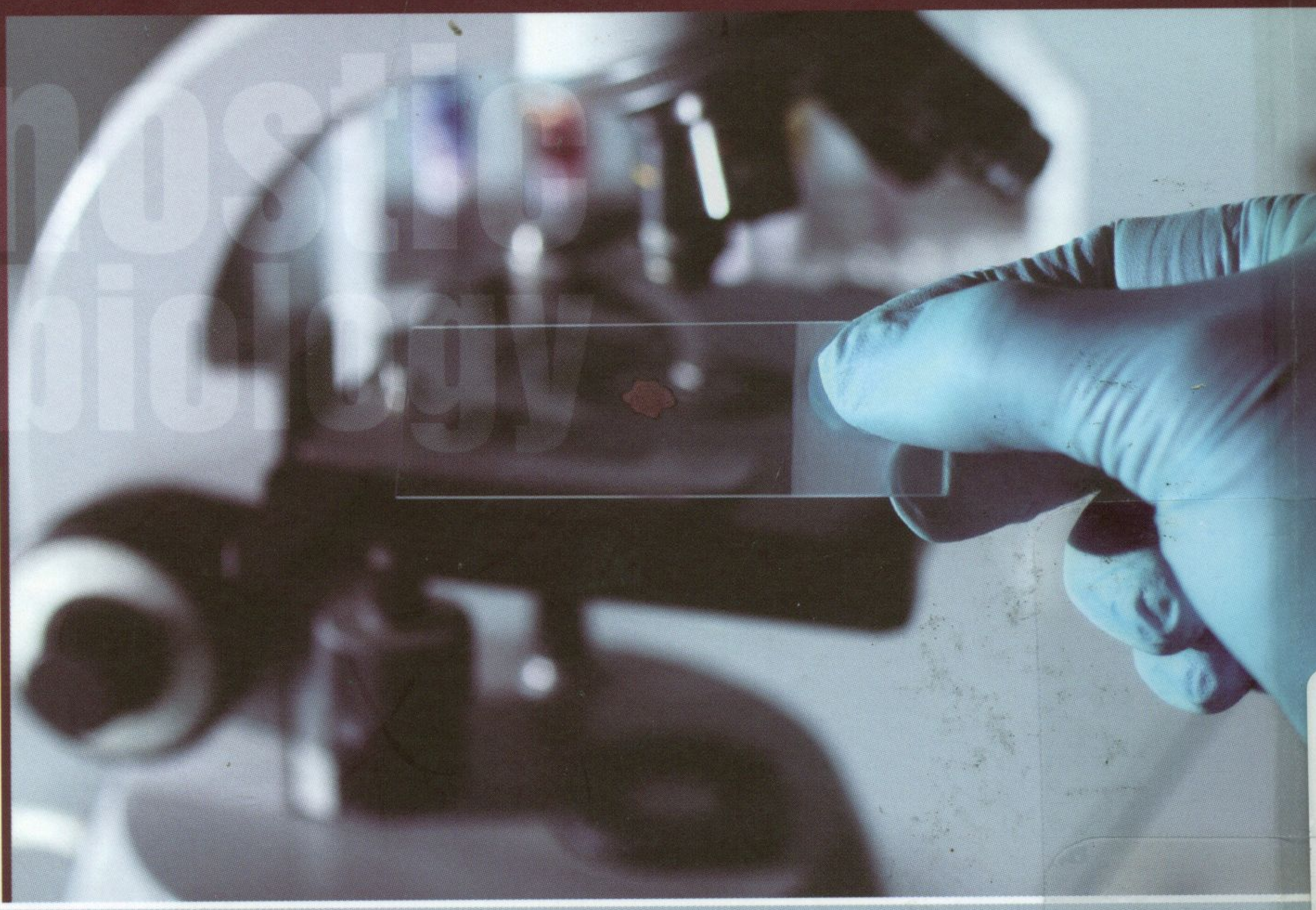
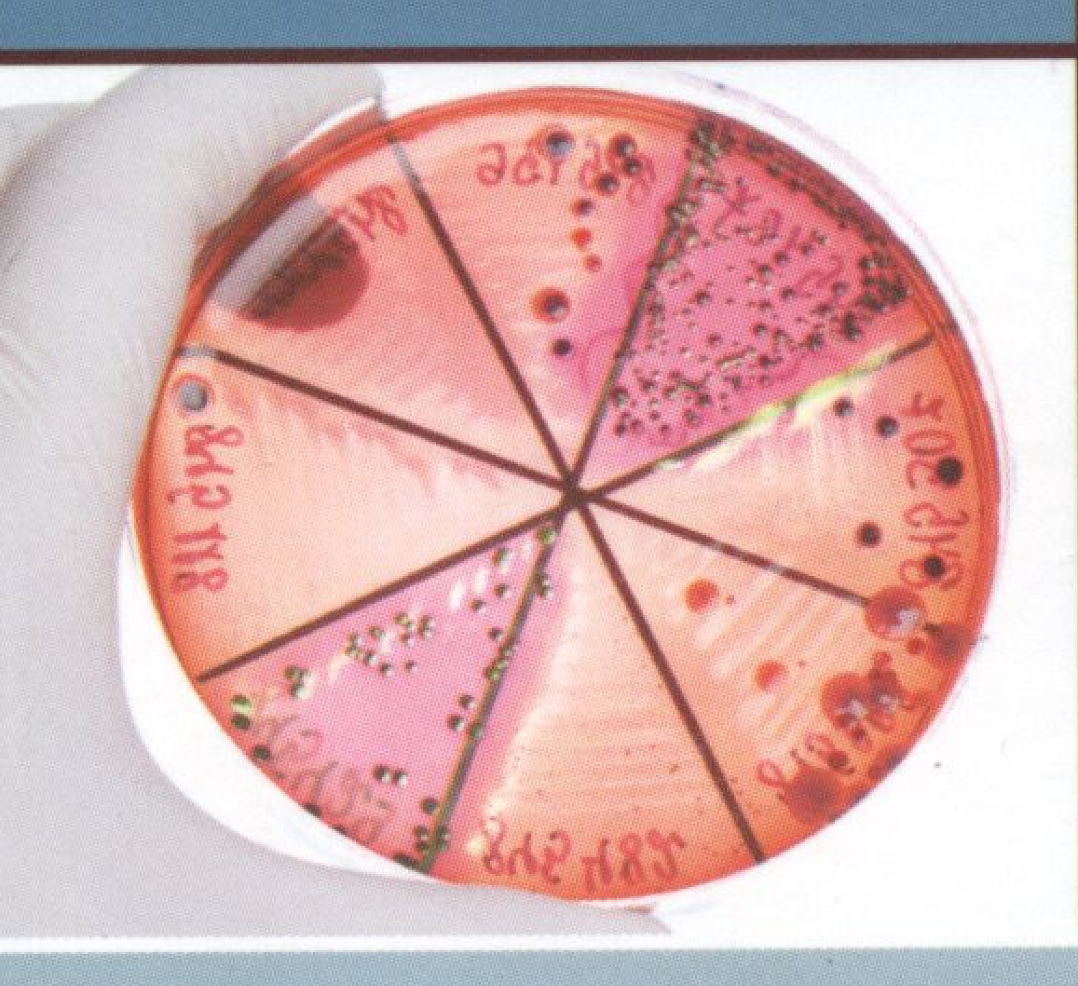
الأحياء المجهرية التشخيصي

Diagnostic Microbiology

الأستاذ الدكتور
عبدالنبي جويد المعموري

المدرس المساعد
اشراق عبدالأمير المعموري







www.darsafa.net

بسم الله الرحمن الرحيم

﴿ وَقُلِ اعْمَلُوا فَسَيَرَى اللَّهُ عَمَلَكُمْ وَرَسُولُهُ وَالْمُؤْمِنُونَ وَسَتُرَدُّونَ إِلَىٰ عَالِمِ الْغَيْبِ وَالشَّهَادَةِ فَيُنَبِّئُكُم بِمَا كُنتُمْ تَعْمَلُونَ ﴾



الإحياء المجهرية التشخيصي

Diagnostic Microbiology

الإحياء المجهرية التشخيصي

Diagnostic Microbiology

الأستاذ الدكتور
عبدالنبي جويد المعموري

المدرس المساعد
اشراق عبدالامير المعموري

الطبعة الأولى

2016م - 1437هـ



دار صفاء للنشر والتوزيع - عمان



دار صفاء للنشر والتوزيع

رقم التصنيف 578.4

الأحياء المجهرية التشخيصي Diagnostic Microbiology

عبد النبي جويد المعموري، اشراق عبد الامير المعموري

الواصفات: علم الأحياء الدقيقة

رقم الإيداع لدى دائرة المكتبة الوطنية (2015/3/1256)

ردمك ISBN 978-9957-24-979-3

عمان - شارع الملك حسين

مجمع الفحيص التجاري تلفاكس +96264612190

هاتف +96264611169 ص ب 922762 عمان 11192 الأردن

DAR SAFA Publishing - Distributing
Telefax: +962 6 4612190 - Tel: + 962 6 4611169
P.O Box: 922762 Amman 11192 - Jordan
E-mail: safa@darsafa1.net
E-mail: safa@darsafa.info
www.darsafa.net

الاهداء

الى سيد المرسلين ونبراس الهدى محمد الامين

الى كل من تعلم واعطى وتصدق بعلمه

الى كل من تواضع وانحنى للعالم الاعلى

المحتويات

المقدمة

تمثل الاحياء المجهرية عالما دقيقا متكاملا بما فيه من تنوع مكوناته وهذا يتطلب اهتما ما فائقا بمعرفة هذه الاحياء وطرق التعرف عليها وتشخيصها باساليب وتقنيات متعددة للوصول الى دقة التشخيص .يحتاج معظم الباحثين وطلبة علوم الحياة وطلبة العلوم الطبية واصحاب مختبرات التشخيص الى دليل يستعان به للوصول معرفة اجناس وانواع الجراثيم المراد عزلها من بيئات وعينات مختلفة والى استخدام طرق متنوعة في التشخيص وتتضاعف هذه الحاجة عند المبتدئين من الطلبة ليتعلموا مباديء التعامل مع هذه الاحياء ومتطلبات العمل يحتوي هذا المؤلف المتواضع على خطوات عملية مفصلة لجمع العينات ، زرعها ، استخدام انواع متعددة من الاوساط ذات الاهمية التشخيصية ،دراسة حساسيتها للمضادات الحيوية بالاضافة الى اعتماد طرق التشخيص التقليدية والحديثة وجميعها معززة بصور ومخططات ايضاحية تسهل عملية الفهم والتحليل .

اخيرا اتمنى ان يكون هذا الجهد خطوة في اتجاه زيادة المعرفة العلمية التجريبية التي يحتاجها الكثير من الباحثين وطلبة العلم .

ومن الله التوفيق

اولا : الأحياء الدقيقة وتحوطات الامان

يمثل مختبر الأحياء الدقيقة(الميكروبات) احد المختبرات المهمة الرئيسة المختبر في جميع المؤسسات الطبية والصحية سواء كانت تعليمية أو بحثية وعلاجية. ولهذا الغرض لابد من اتباع وصايا وتوجيهات السلامة والامان ومنها ما يأتي :

1) يجب اعتبار كل عينة تصل إلي المختبر على انها ،معدية والتعامل معها علي هذا الأساس.
2) جميع المواد الكيميائية التي تستخدم في المختبر والتجارب تعد مواد خطرقيجب التعامل معها على انها مؤثرة لذا من الضروري الانتباه الى توجيهات الاستاذ والارشادات المثبتة على العبوات.
3) يجب الالتزام باستعمال الملابس والاقنعه الواقية وإتباع توجيهات وإرشادات ذوي الخبرة في مختبرك.
4) يجب عدم الأكل والشرب داخل المختبر أو وضع مأكولات أو مشروبات في مبردات المختبر.
5) يجب عدم استخدام الفم أو لمس العينين أثناء العمل داخل المختبر.
6) تكتب المعلومات على الأطباق والأنابيب بطريقه مثالية(على الطبق وليس على الغطا).
7) إتباع الأسلوب السليم في التخلص من أي مواد(حيوية أو كيميائية).
8) ارتداء الصدرية Lab coat.
9) عدم اصطحاب الأدوات الشخصية والحقائب النسائية إلي المختبر حرصا علي عدم تلوثها وعزلها في مكان بعيد عن مكان العمل .

10) استشارة الاستاذ المشرف عند الحاجة لنقل وتحريك بعض المستلزمات المختبرية عدم لمس أو تحريك أي جهاز أو مستنبت أو أي من أدوات المختبر إلا بعد التعرف عليها وشرح طريقة وكيفية استخدامها بواسطة المشرف.

11) يجب تنظيف وتطهير مكان إجراء التجارب المختبرية بمطهر قبل وبعد إجراء التجارب.

12) في حالة تلوث مكان العمل أو انسكاب أي ماده ،يجب أخبار المشرف فوراً.

13) غسل اليدين جيداً بالماء والصابون ومسحها بالمطهر قبل مغادرة المختبر.

اجراءات العمل للزرع البكتيري.

1) يجب مسح وتعقيم مكان العمل قبل وبعد التجربة بالمواد المطهرة.

2) عدم وضع المزارع البكترية (Bacterial Cultures) الأوساط الزراعية Inoculated Media علي الطاولة العمل مباشرة بل وضعها في الحوامل أو السلال (Baskets) أو أي وعاء آخر مخصص لهذا الغرض.

3) يجب حرق إبرة التلقيح (Loop) أو الإبرة الناقلة (Needle) لحد الاحمرار قبل وبعد كل الاستعمال.

4) 4- توضع المواد الملوثة (Contaminated Material) والمزارع القديمة (Old Cultures) وبنتائج العمل الذي أنهيته في الأوعية المخصصة لذلك.

5) يجب عدم استعمال الفم عند استعمال الماصات لنقل المزارع الميكروبية وفي حالة عدم توفر الماصات الميكانيكية يستحسن وضع كمية من القطن في النهاية العريضة للماصة قبل تعقيمها .

كيفية اعداد التقرير .(Laboratory Reports)

1) عنوان التجربة.

2) الهدف من إجراء التجربة.

3) طريقة العمل .

4) النتائج ويجب أن تذكر تلك التي يحصل عليها الطالب كما هي وان كانت غير مشجعه وينظم جدول بها .

5) المناقشة من خلال مناقشة النتائج لمعرفة قربهاعن المتوقع مع ذكر الأسباب المؤدية لذلك من خلال المعلومات العملية والنظرية التي اكتسبها.

ثانيا : الاجهزة المستخدمة في مختبرات الاحياء المجهرية .

1. الاجهزة:

أ- الحاضنات (Incubators) وتسهل استخدام درجات حرارية مختلفة حسب نوع الكائن المجهري ودرجة الحضن المطلوبة.

ب- اجهزة التعقيم: مثل الموصدة واجهزة الاشعة المختلفة .

ج- الثلاجات.

د- جهاز رج واهتزاز(Shaker).

ه- موازين مختلفة(Balances).

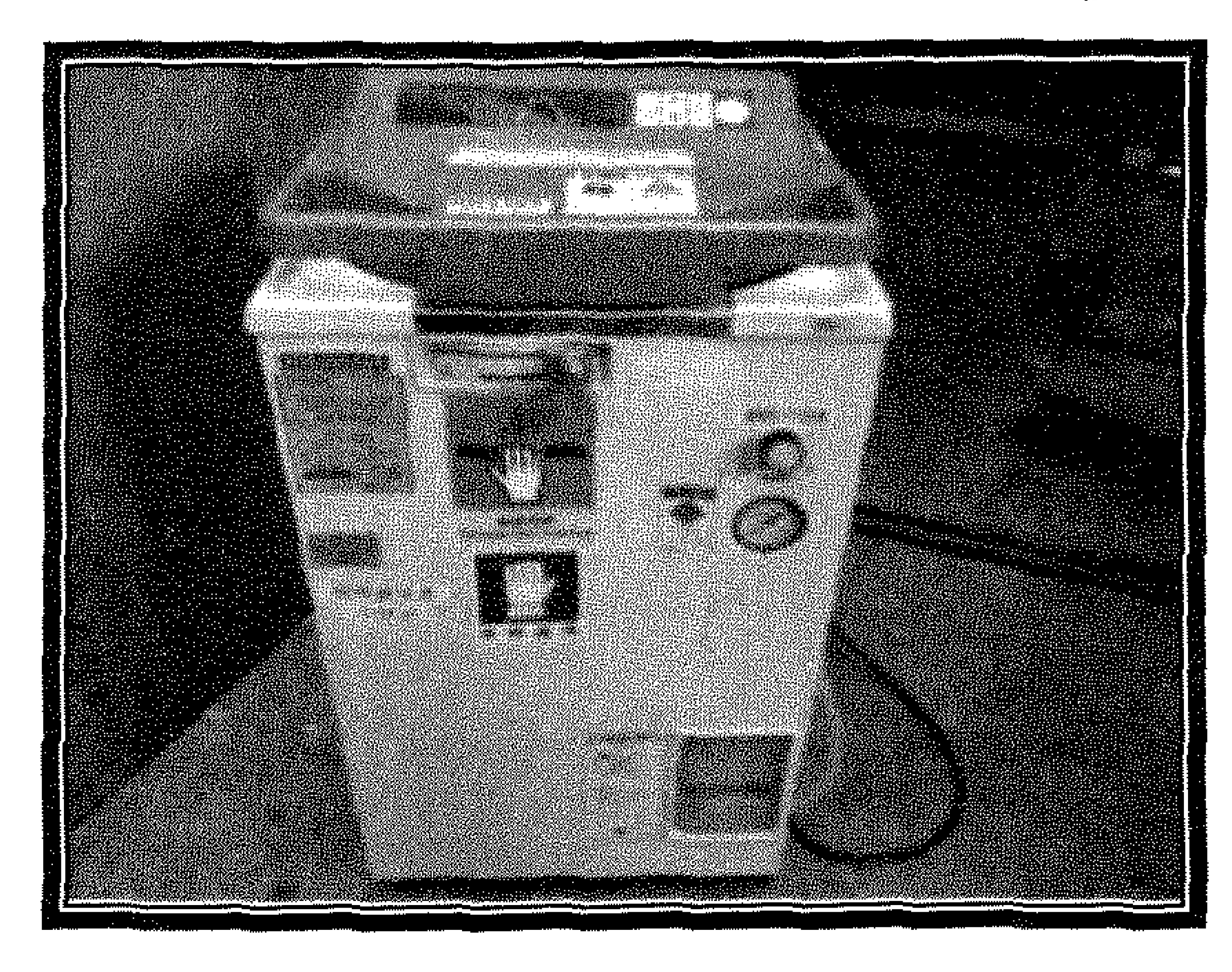
و- حمامات ماء ذات مواصفات متباينة (Water Baths).

ز- جهاز قياس الدالة الحامضية (PH Meter).

ح- جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer)

ط- مجاهر ضوئية مركبة (Compoound microscopes).

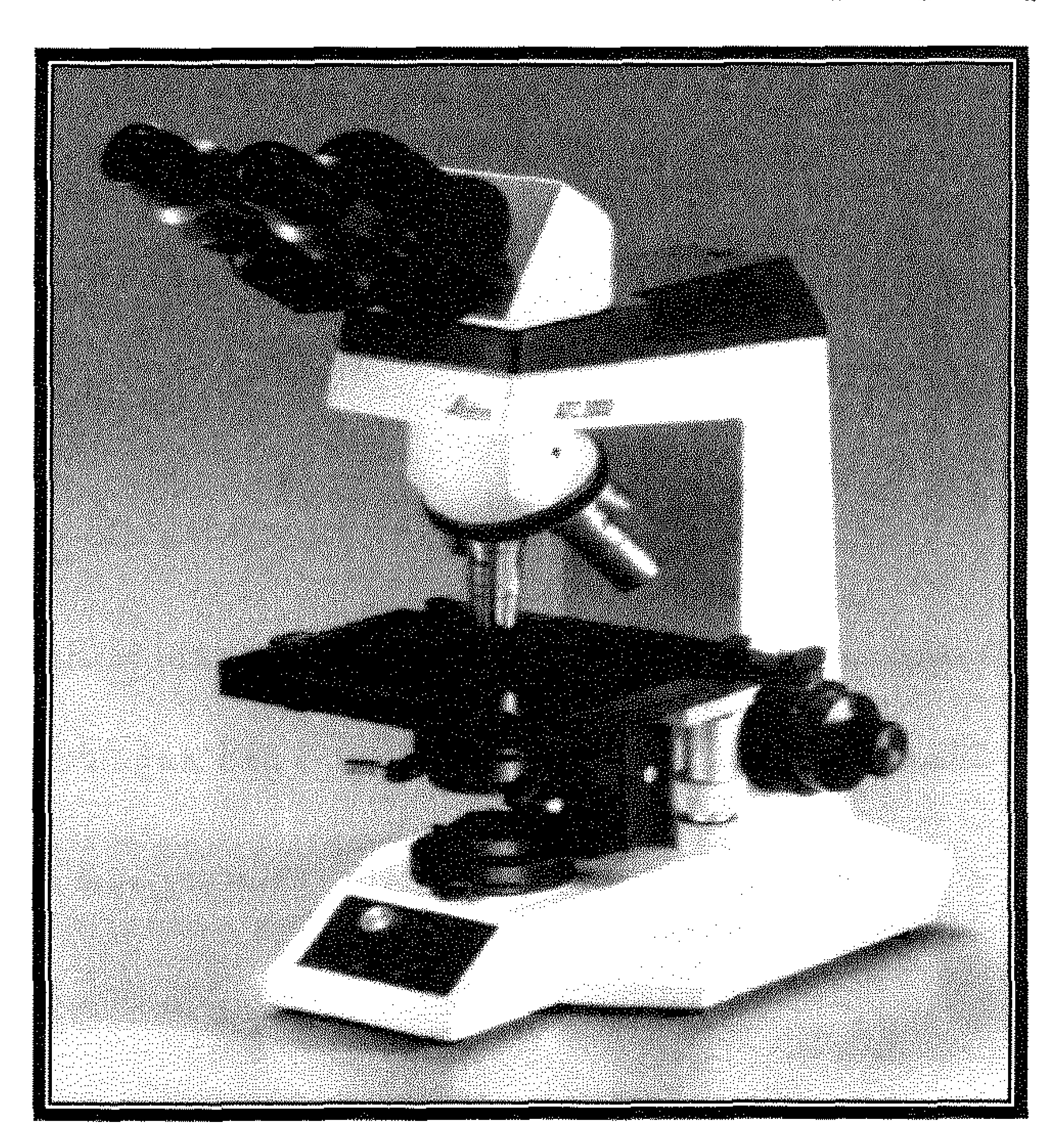
ي- جهاز النبذ مركزي (Centrifuge).**شكل(1)**



شكل(1)جهاز النبذ المركزي .

المجهر :

يضم مجموعة مكونات كالعدسات ،ذراع stage، والحامل للشريحة، تحت الشريحة مكثف يجمع الأشعة مصدر الضوء ويسقطها على الشريحة ثم على العدسة الشيئية على العين **شكل (2)**.



شكل (2).يبين المجهر الضوئي واجزاءة.

أنواع العدسات :

1. عدسات شيئية : زيتية قوة 100 للبكتريا وقوة 40 لملاحظة الشكل الظاهري والاحياء الكبيرة متعددة الخلايا .
2. عدسات عينية ذات تكبير 10 X.

2.الادوات الزجاجية(Glass Wares)

أ- اواني زجاجية(Glass Wares) مثل الدوارق (Conical Flasks) والبيكرات (Beakers) والدوارق الزجاجية الحجمية (Volumetric Flasks) واسطوانه مدرجة (Measuring Cylinders) وسحاحات(Burettes)ونواقيس زجاجية (Bel jars) وانابيب اختبار(Test tubes) وماصات مختلفة الاحجام (Pipetts).

ب- اطباق بتري (Petridishes) وشرائح زجاجية (Slides) واغطية شرائح (Cover Slips).

ج- قواطع فلينية(Cork borers)ذات احجام مختلفة.

د- ابرة تلقيح (Inoculation needles) وابرة تلقيح ذات عقد Inoculation loop needles) وملاقط (Forceps) مختلفة الاحجام ومقصات (Scissors).

ه- اجهزة قياس درجات الحرارة(Thermometers).

و- مجفف(Desiccator).

ز- جهاز تقطير الماء (Water distillation).

ح- حوامل انابيب اختبار معدنية وخشبية وزجاجات غسيل(Washing bottles) واواني(Trays) مختلفة الاحجام.

ط- شريحة عد المستعمرات (Quebec colony counter).

ي- ردهة عزل وزرع الجراثيم (Isolation cabinet).

ك- سلات مهملات (Disposal vessel)بالاضافة الى ارضية خاصة للنفايات الزجاجية.

ل- اقلام شمعية(Wax pens) واوراق لاصقة(Label Papers) واقلام تعليم Marker pens.

م- مساحيق تنظيف وصابون وقماش للتنشيف.

ن- مصباح بنزن (Benzen flame).

س- ادوات تشريح(Dissection tools).

ثالثا . الاوساط الزرعية Culture Media

تكمل اهمية الوسط الزرعي في كونه يتماشى مع احتياجات ومتطلبات الكائن المجهري الحي من مواد غذائية ومتطلبات نمو اخرى تساهم في نموه وتضاعفه وتحتوي معظم الاوساط الصلبة على مادة الاكار جيلاتينية القوام والتي تستخلص من نوع من الطحالب وهي الطحالب الحمراء والتي تمثل المكون الصلب للوسط الزرعي. يحتوي الوسط على سكريات متعدده، بالاضافه الى مكونات اخرى مثل :الكاربون والنيتروجين والماء، سكريات احاديه او ثنائيه، صبغات وكواشف، املاح، مضادات حيويه، انزيمات، احماض امينيه ونوويه، Co-Factors، مثبطات نمو لبعض المجاميع الميكروبيه وغيرها. بالاضافه الى الاس الهيدروجيني pH والذي يحدد طبيعه الحامضيه للوسط بما يلائم كل مجموعه او كائن مجهري ،البيئة الغذائية قد تكون بسيطة أو معقدة التركيب وفي كل صورة تعمل على توفير الطاقة والوحدات الأساسية لبناء أجزاء الخلية

الغرض من استخدام الاوساط الزرعية :

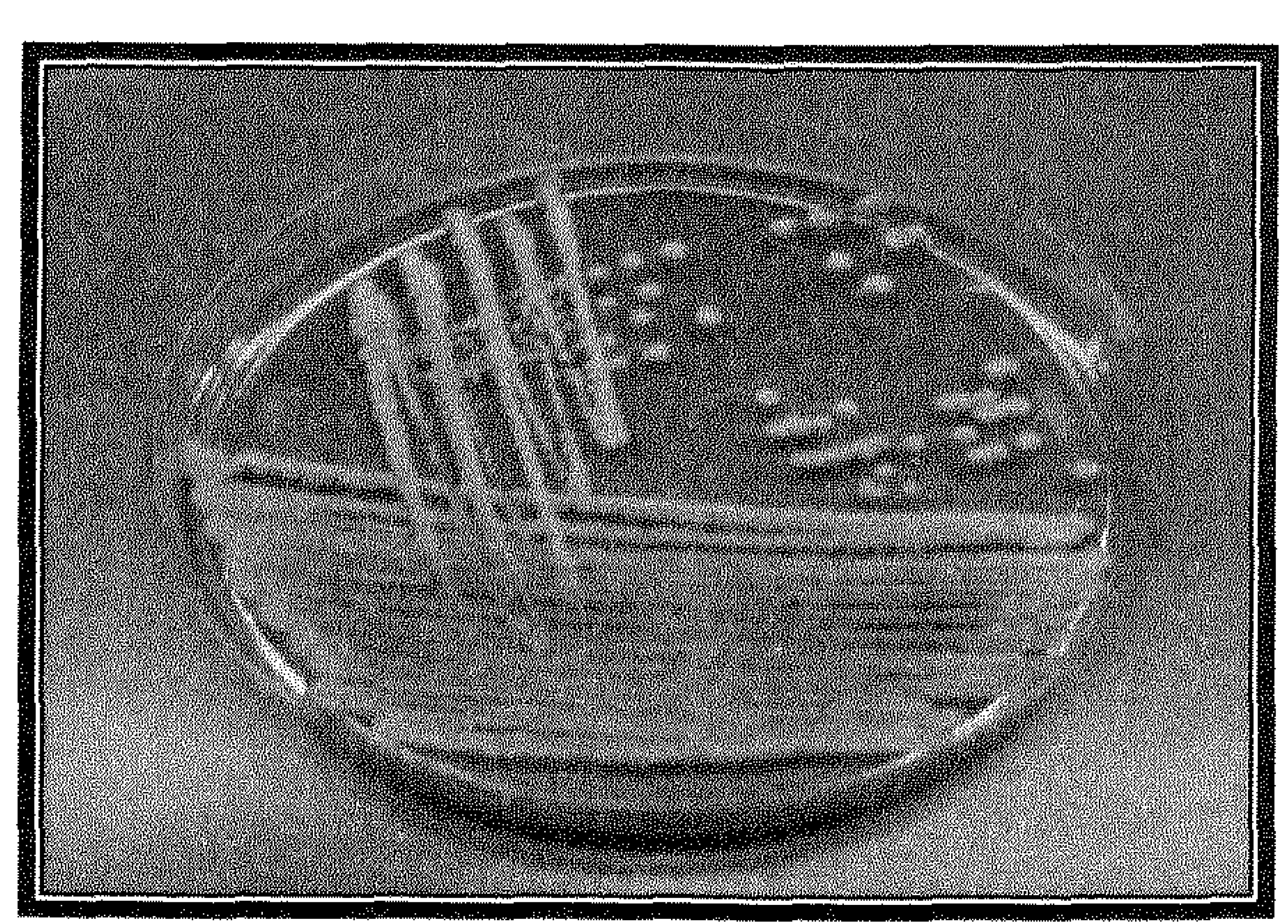
1. تنمية الاحياء الدقيقة في ظروف مماثلة لنموها .
2. معرفة قدرة الكائن الحي على استهلاك مادة غذائية محددة وهذا يسهل تشخيص الكائن .
3. حث للكائنات الدقيقة على أنتاج أو تكوين بعض المواد.
4. تصنيف للكائنات الدقيقة ودراسة صفاتها المزرعية.
5. تساهم بطريقة حفظ الاحياء لفترات زمنية معينه وامكانية نقلها من مكان لاخر .

تقسيم الاوساط الزرعية:

◆حسب تركيبها الكيميائي Chemically defined media:

يتكون من الأملاح المعدنية مضاف لها بعض مصادر الكربون و النيتروجين أو عوامل النمو، وهي الاوساط التي تشمل الاحتياجات العامة للميكروبات من مركبات الكربون والطاقة ومن مستلزمات النمو الأخرى .

1. وسط ماء الببتون Peptone Water وهي وسط سائل يظهر فيه النمو على شكل عكارة حره ، وتستخدم هذا الوسط في اختبار الاندول Indole test .
2. وسط الاكار المغذي Nutrient Agar وهو وسط صلب لاحتوائه على الاكار وينمو عليها طيف واسع من البكتريا و بعض أنواع الفطريات و الخمائر شكل (3).



شكل (3)يبين نمو البكتريا على وسط الاكار المغذي .

◆حسب قوامها

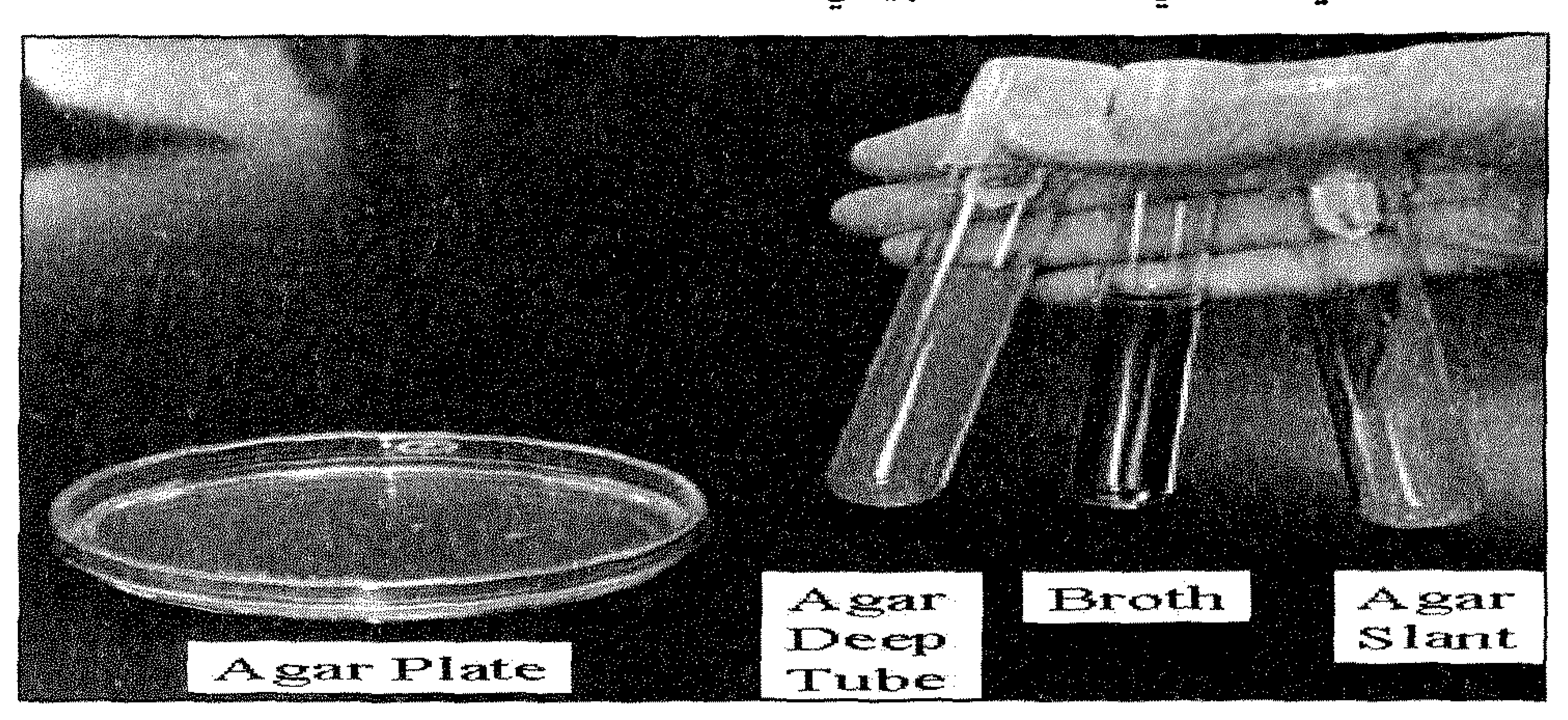
تقسم الاوساط حسب قوامها الى مجموعة اقسام تعتمد على نوع المواد الداخلة في الوسط:

1. **وسط صلب Solid media**: غير قابلة للإسالة مثل بيئات شرائح البطاطس أو الجزر. الوسط الصلب يهيئ سطح مستوي يساعد على نمو البكتيريا على هيئة مستعمرات فردية يسهل عزلها بحالة نقية

2. **الاوساط الصلبة قابلة للإسالة Solid-reversible to liquid** : مثل الاوساط الزرعية التى يدخل فى تركيبها الاكار و الجيلاتين.

3. **الاوساط نصف صلبة Semi solid media** : بيئة تحتوى كمية من الاكار لا تزيد عن ربع الكمية التى تضاف الى البيئات الصلبة القابلة للإسالة تبعا لنوع الاكار المستخدم .

4. **الاوساط السائلة Liquid media** : لا تحتوي على أي قوام صلب مثل: المرق المغذي(صناعي) – اللبن (طبيعي) **شكل (4)**



شكل (4) تقسيم الاوساط الزرعية حسب القوام الى وسط صلب (طبق الاكار) ووسط الاكار السائل.

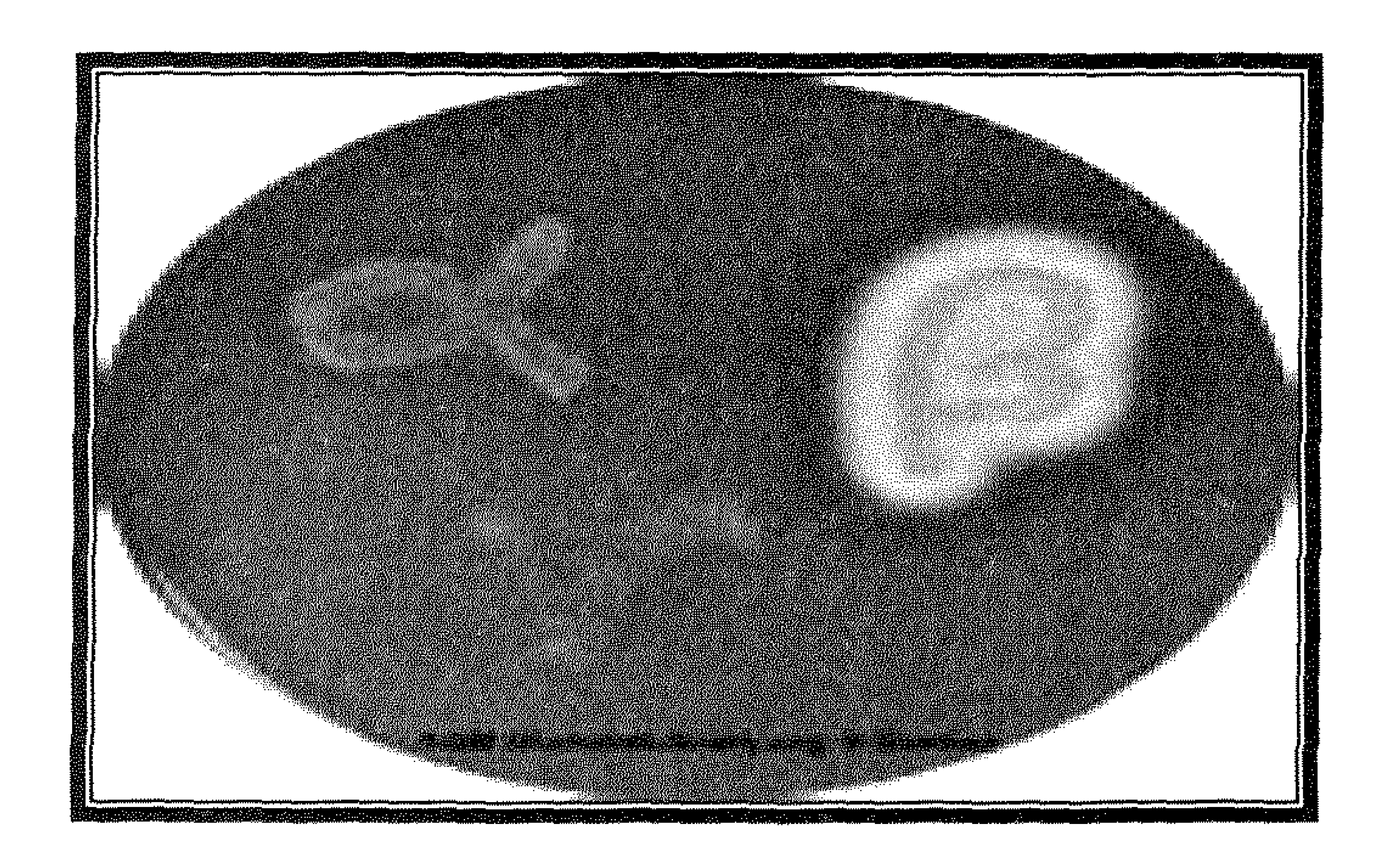
◆حسب الغرض منها:

تقسم الاوساط الزرعية اعتمادا على الحاجة في تشخيص نوع معين او اظهار صفة وخاصية يتميز بها كائن مجهري دون غيره اتمادا على المواد المضافة للوسط ويضم هذا القسم عدة اوساط.

الأوساط الغنية Enriched media :

أوساط عادية بسيطة مضافاً إليها مواد غذائية غنية مثل الدم، المصل، مستخلصات النباتات أو الحيوانات لمواجهة متطلبات النمو الصعب مثل اكار الدم – اكار اللبن – اكار السيروم.

أ- **وسط أكار الدم Blood agar** (وهو وسط الاكار المغذي مضاف إليها 5-10٪ دم أغنام أو دم إنسان ، ويضاف الدم بعد تعقيم الوسط وتركه ليبرد لدرجة حرارة 55م تقريبا)، ولا تحتوي هذا الوسط على اى دليل كيميائي لذلك يمكن تحضينها تحت ظروف لا هوائية أو في حضانات ثاني أكسيد الكربون CO_2، ويتم إنماء بعض أنواع من البكتريا المنتجة للسموم المحللة لكريات الدم الحمراء مثل الجنس *Streptococcus* الذي يتباين فيه نوع التحلل حسب النوع.**شكل (5)**.

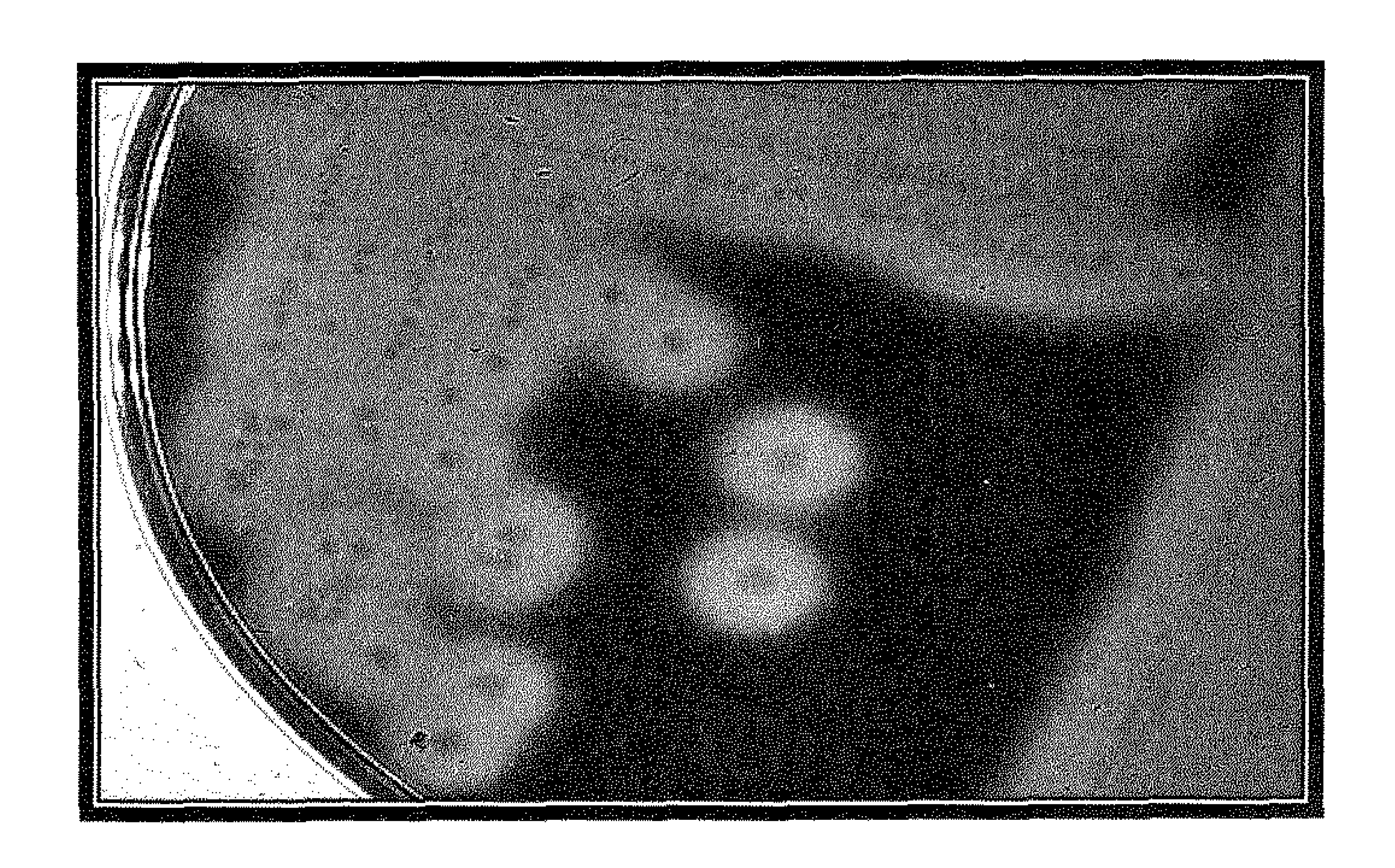


شكل (5) يبين انواع تحلل الدم على وسط اكار الدم .

ب- **وسط أكار الجوكليت Chocolate agar** وهي وسط أكار الدم ولكن عند إضافة الدم للوسط يتم تسخين الوسط تحت 100 م حتى يتم تكسير لكريات الدم الحمراء وتحرر مكوناتها في الوسط ، وتتطلب هذه المكوناتتكون مطلوبة وضرورية لبعض أنواع من البكتريا لكي تستطيع النمو مثلا *influenza Haemophilus*

الاوساط الزرعية الاختيارية (انتقائية) Selective media:

يحتوي على مادة تثبط نمو بعض أنواع البكتيريا بينما تساعد نمو أنواع أخرى. وهذا النوع من الاوساط يساعد في الحصول على مزرعة نقية من مجموعة متنوعة للبكتيريا مثل إضافة بعض المواد بتركيز معين كالصبغات، أملاح الصفراء، المضادات الحيوية، الأحماض للسماح بنمو مجموعة من البكتيريا دون غيرها كإضافة صبغة البنفسج البلوري بتركيز معين يؤدي إلى نمو مختلف أنواع البكتيريا السالبة لصبغة جرام ويمنع نمو البكتيريا الموجبة.**شكل (6)**

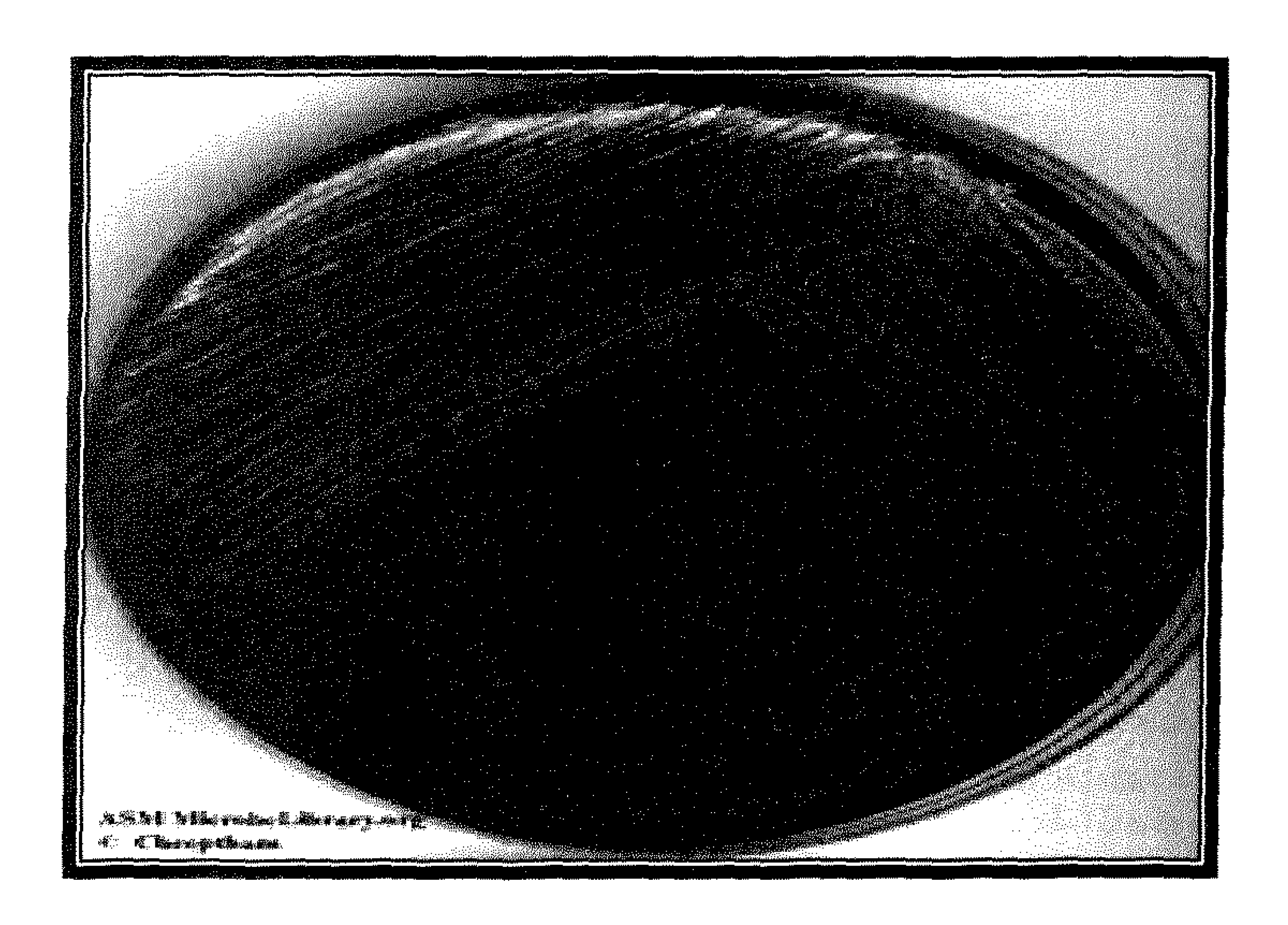


شكل (6)يبين نمو البكتريا السالبة لصبغة كرام على وسط الماكونكي.

الاوساط الزرعية التفريقية Differential media :

هي الأوساط التي تسمح بنمو نوعين من البكتيريا يمكن التمييز بينهما مثل :

- وسط آكار الدم فبإضافة الدم إلى الوسط الزراعي يسمح بتمييز البكتيريا المحللة للدم وغير المحللة، حيث تظهر حلقة فارغة حول المستعمرة المحللة، وبذا تلعب الأوساط المحتوية على الدم دور الوسيط الغني المفرق في الوقت ذاته.
- وسط ايوسين ازرق الميثلين EMB)) يستخدم لتمييز بكتيريا *E.coli* (مستعمرات ذات مركز اسود وبريق معدني مخضر) عن باقي انواع بكتيريا القولون.**شكل (7)**



شكل (7) نمو مستعمرات *E.coli* على وسط EMB.

رابعا : التعقيم Sterilization

تستخدم عملية التعقيم لازالة و قتل جميع الجراثيم في شكلها الخضري أو في صورة جراثيم ناضجة موجودة في الوسط المراد تعقيمه سواء كان ذلك الوسط بيئة غذائية أو محاليل مختلفة أو أماكن أو مسطحات محدودة في إبعادها أو إحجامها وعادة يتم التعقيم بالتباع طرق عديدة قد تكون فيزيائيه أو كيميائيه أو ميكانيكيه .

اولا:الطرق الكيميائية Chemical methods

يوجد انواع مختلفة من المواد الكيميائية التي تستخدم بشكل محاليل لاغراض التعقيم .

1. كحول الإيثيل : يستخدم بتركيز من 50- 70٪ في تطهير الأيدي أو المناطق المختلفة في الجسم و يرجع تأثيرها المميت إلى تجميعها وتخثيرها للبروتين الخلوي .
2. الكلوروفورم: تعتبر من المطهرات الطيارة وتستخدم في تعقيم بعض المواد مثل سيرم الدم ويتم التخلص منه بتسخينة على حمام مائي على 75م كي يتطاير.
3. الفينول أو حامض الكربوليك :تستعمل للتعقيم السطحي للأرضيات الغرف والعيادات و بعض الأدوات والأجهزة مثل الفينول بتركيز 5٪ .
4. كلوريد الزئبقيك : لتعقيم الأيدي و المناضيد ودرنات البطاطس تستخدم لتعقيم الأسطح الخارجية للنباتات اثناء عزل الميكروبات المرضة له والموجودة بداخلة يستخدم بتركيز 1000.

ثانيا :الطرق الميكانيكية Mechanical methods

تعد هذه الطريقه مهمه في إزالة خلايا الكائنات الحية الدقيقة من الوسط الكامنة فيه بطريقة ميكانيكية كأن تحجز الثقوب الدقيقة للمرشحات المستعملة خلايا الكائنات الحية ذات الأقطار التي تزيد عن أقطار ثقوبها و التعقيم بالمرشحات لايتوقف على قطر الثقوب فقط بل يتوقف أيضا على الشحنة الكهربائية للمرشح وكذلك الشحنة الكهربائية للكائنات الدقيقة المحتوي عليها السائل وهناك انواع من المرشحات تختلف فيما بينها في نوع المادة المصنوع منها المرشح وهي:

1. مرشح بيركفيلد : هو مصنوع من الطين الدياتومي .
2. مرشح زايتس :وهو مصنوع من مادة الأسبستوس .
3. مرشح عجينة باريس :وهو مصنوع من الجبس.
4. مرشح الزجاج المسامي: وهو مصنوع من الزجاج الذى تتخلله مسامات محددة الاقطار.
5. المرشحات الغشائية أو الجزيئية ويصنع من إسترات السيلولوز التغذية، تستعمل لمنع نمو البكتيريا غير ذاتية التغذية .

ثالثا:الطرق الفيزيائية :Physical methods

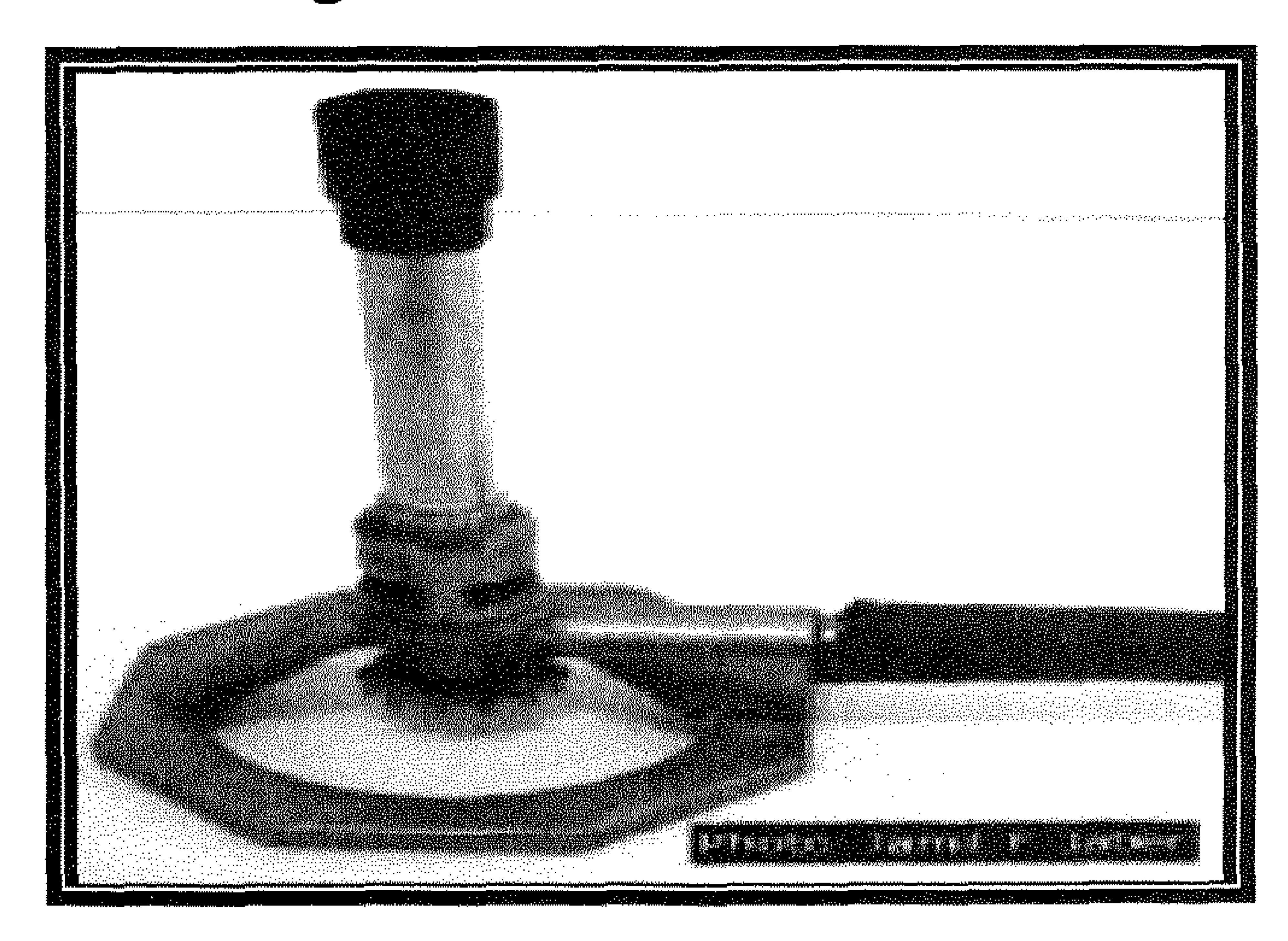
تعتبر الحراره المرتفعة و الإشعاعات من أهم العوامل الفيزيائية التي تستعمل في أغراض التعقيم غير إن التعقيم الحراري هو أكثر أنواع التعقيم شيوع لسهولة استعماله وكفائته في التعقيم مثل الحرارة والاشعة .

أ: الحرارة:

1. الحرارة الجافة Dry heat sterilization

2. اللهب المباشر Incineration heat

ويستخدم لهب بنزن لتعقيم إبرة التلقيح ، وكذالك الشرائح الزجاجية وفوهة الأنابيب وفوهة الدورق والاطباق الحاوية على الزرع .**شكل (8)**



شكل (8) لهب بنزن المستخم لاغراض التعقيم .

3. أفران الهواء الساخن hot air oven

ويستعمل في تعقيم الأواني الزجاجية ، أطباق بتري ، الماصات وذالك بعد وضعه في اسطوانة معدنيه خاصة بكل منها ، وتوضع هذه الاسطوانات داخل المعقم على درجة حرارة 180 م لمدة 30 دقيقه أو 160 م لمدة ساعة ، وبعد التعقيم يترك المعقم بعض الوقت حتى يبرد ثم يفتح ونستخرج منه الأدوات حتى لا تبرد فجأة مما قد ينشأ احتمال كسرها وتلويثها .

4. التلهيب الكحولي Alcohol flaming

يستخدم في تعقيم بعض الأدوات كالمشرط ، الملقط ، المقص وذلك بغمر الجسم المراد تعقيمه في كحول ايثيلي ثم يعرض للهب المباشر فيشتعل ما يعلق به من كحول وهنا يستخدم كلا من الكحول والحرارة كمواد معقمة .

5. الحرارة الرطبة Moist heat

ويقصد به استغلال بخار الماء(الهواء الرطب) في إجراء التعقيم بدلا من الهواء الساخن.

6. معقم ارنولد Arnold sterilizer

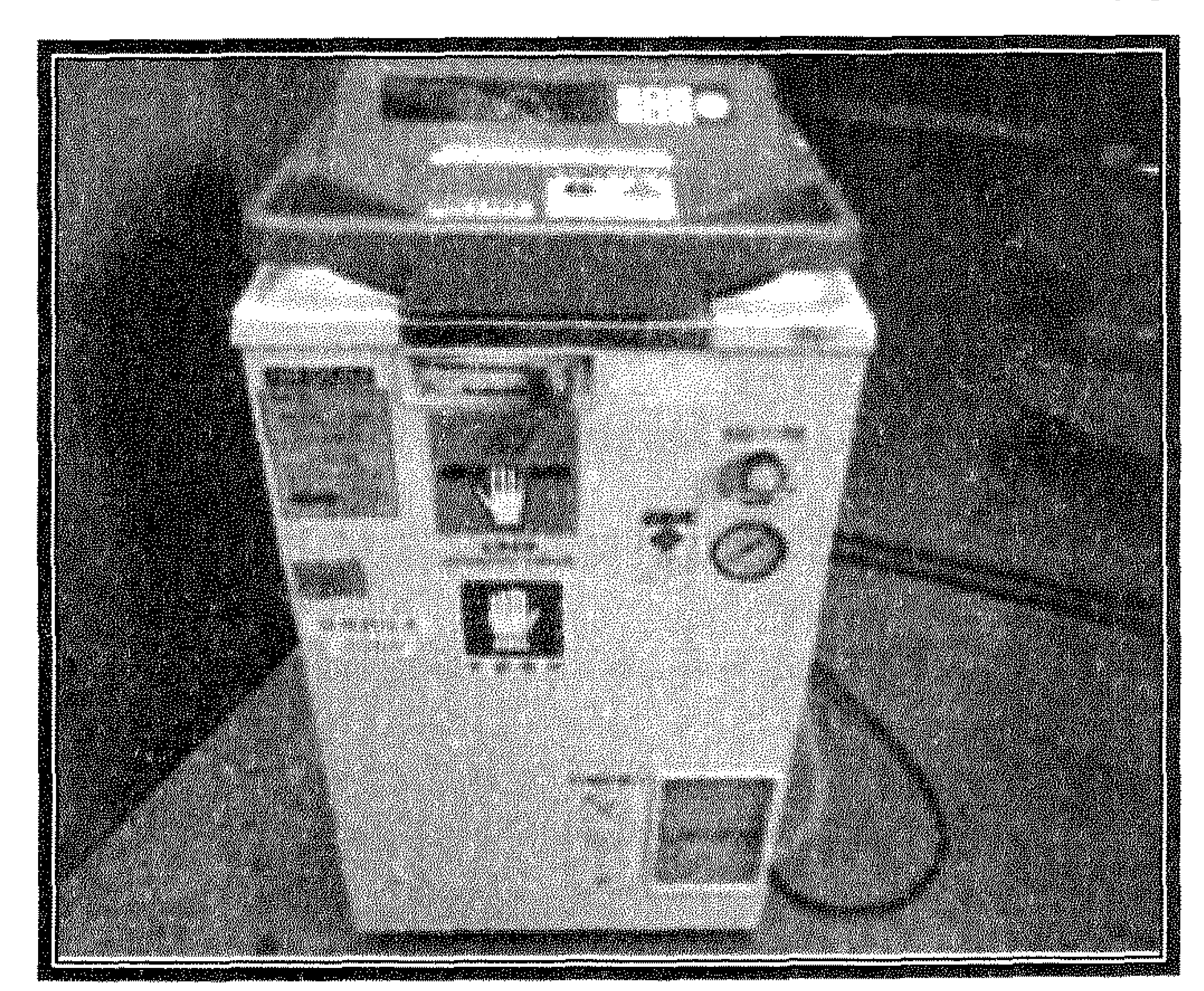
وفيه يستعمل البخار على 100 م فقط .وهو عبارة عن إناءحاوي على عدد من الرفوف او الخانات توضع بها الاوساط والمحاليل المراد تعقيمها ويحوي هذا لاناء على الماء ، ويلحق بالجهاز ثيرمومتر.

يستعمل هذا المعقم في تعقيم الاوساط الزرعية التي تفسد عند استعمال الحرارة العالية "أ لاكثرمن "100م" مثل الاوساط التي يدخل في تركيبها الجلايتين أو اللبن أو السكريات التي تتلف بالحرارة العالية ،ويتم التعقيم في هذا النوع من الاجهزه على ثلاث فترات في ثلاثة أيام متتالية، ويعرف التعقيم في هذه الحالة بالتعقيم المتقطع.

7. الموصدة Autoclave

تستخدم طريقة البخار الهواء الحار كاحد الطرق الاساسية في التعقيم وتعد أحسن وأسرع وسائل التعقيم لقدرة الحرارة الرطبة على الاختراق و قتل الجراثيم ، وللقيام بهذا النوع يستعمل جهاز "الاوتوكلاف Autoclave"، وهو عبارة عن اسطوانة معدنية متينة لكي تتحمل الضغط وبداخلها يوضع الماء ثم توضع المواد والاجهزه المراد تعقيمها على أرفف خاصة ، ويوجد للجهاز غطاء خاص . ومن المعروف إن الماء يغلي عند 100م تحت الضغط الجوي العادي، وترتفع هذه الدرجة إذا ارتفع الضغط داخل الوعاء الذي يوجد به الماء **شكل (9)** يستخدم الاوتوكلاف في تعقيم :

- معظم الاوساط المغذية التي تتحمل درجات الحرارة المرتفعة مثل بيئة الآجار المغذي .
- الشاش والقماش والقطن .



شكل (9) المزارع الميكروبية المراد التخلص منها كمزارع البكتيريا المرضية يتم تعقيمها في الاوتوكلاف لمدة15 _20 دقيقه بدرجة حرارة 120 م .

ب .الإشعاعات Radiations

تتنوع مصادر الاشعاعات وتاثيراتها على الاحياء وتمثل اشعة الشمس احد المصادر المهمة لبعض انواع الاشعاعات التي يستفاد منها طبيعيا في التعقيم وبالرغم من التاثير الضار لعدد من الاشعاعات الا انه بالامكتن الاستفادة من هذا التاثير الضار في قتل الجراثيم وتعقيم بعض الاماكن والادوات المهمة والمواد الغذائية المصنعة .

الأشعة فوق البنفسجية Ultraviolet radiation

تضم الاشعة فوق البنفسجية مديات مختلفة من الاشعاع حسب طولها الموجي ودرجة تاثيرها ولذلك تقسم حسب مداها الى A,B,C تستعمل هذة الأشعة أكثر من غيرها من أغراض التعقيم ويلاحظ أن الأشعة البنفسجية لها قدرة ضعيفة على التغلغل داخل الأشياء من ذلك نرى أن فعلها التعقيمي سطحيا و قد يعزى تأثيرها على الخلية .

الأشعة السينية x-ray (ذات الموجات القصيرة) و اشعة كاما - Gamma Ray تستخدم لأغراض التعقيم وهذة الإشعاعات لها قدرة على إختراق الأجسام الصلبة و التغلغل فيها ولكنها تتطلب أجهزة خاصة ذات تكاليف عالية .

خامسا :المزرعة النقية

المزرعة النقية هي المزرعة التي تحتوي على نوع واحد فقط من الأحياء الدقيقة.

المزرعة المختلطة هي المزرعة التي تحتوي على أكثر من نوع من الأحياء الدقيقة.

تختلف المستعمرات النامية في الشكل، والحجم، والقوام، واللون باختلاف أنواع الكائنات الدقيقة، فان مظهر المستعمرة يعتبر دليلا قيما للتعرف على المزرعة وللتأكد من نقاوتها.

الحصول على مزارع نقية

- للحصول على مزارع نقية من البكتيريا (أو أي نوع من الأحياء الدقيقة) لا بد أولا من الحصول على مستعمرات مفردة single colonies منفصلة عن بعضها البعض وعلى اوساط زرعية صلبة . solid media.
- يفترض أن تكون المستعمرة النقية خلية واحدة من البكتيريا نمت وتكاثرت حتى كونت مجموعة من ملايين الخلايا البكتيرية واضحة المعالم ولها صفات الخلية الأم نفسها.

أولا: الأطباق المخطوطة Streak Plate

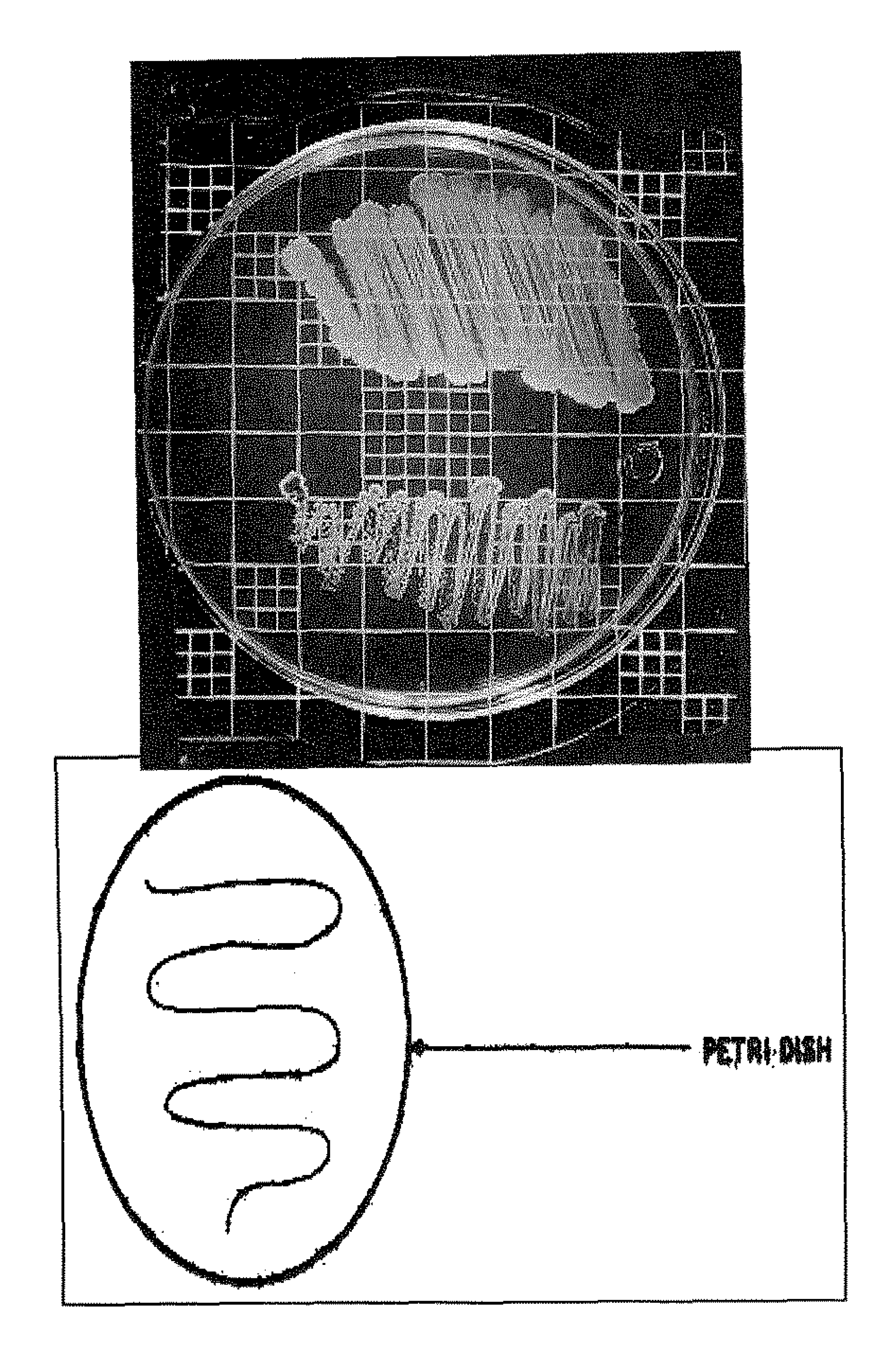
عند وضع المزارع الميكروبية على سطح الآكار ونشرها بواسطة الإبرة ذات عقدة (loop) ، فان هذا يسمى تخطيط (Streaking) ، ويسمى الطبق المعد بهذه الطريقة طبقا مخطوطا (Streak Plate) .

الهدف من الحصول الأطباق المخطوطة:

في هذه التجربة يحدث تقليل لتركيز الميكروب بمعنى أنه كلما ازدادت عملية التخطيط كلما حصلنا على تركيز أقل للميكروب ويتم ذلك بواسطة الحصول من معلق البكتيريا المركز على مستعمرات منفصلة ونقية، وعند التلقيح فان الخلايا الكثيرة المتزاحمة الموجودة في بداية التخطيط تكون مستعمرات قريبة من بعضها، ولكن باستمرار التخطيط نلاحظ إعداد اقل فاقل إلى أن تبقى مستعمرات منفصلة تماما ومتباعدة. يمكن عمل الأطباق المخطوطة بأكثر من طريقة كما في الشكل (10)

الزرع البكتريا بطريقة التخطيط بشكل Zigzag or Snake shape :

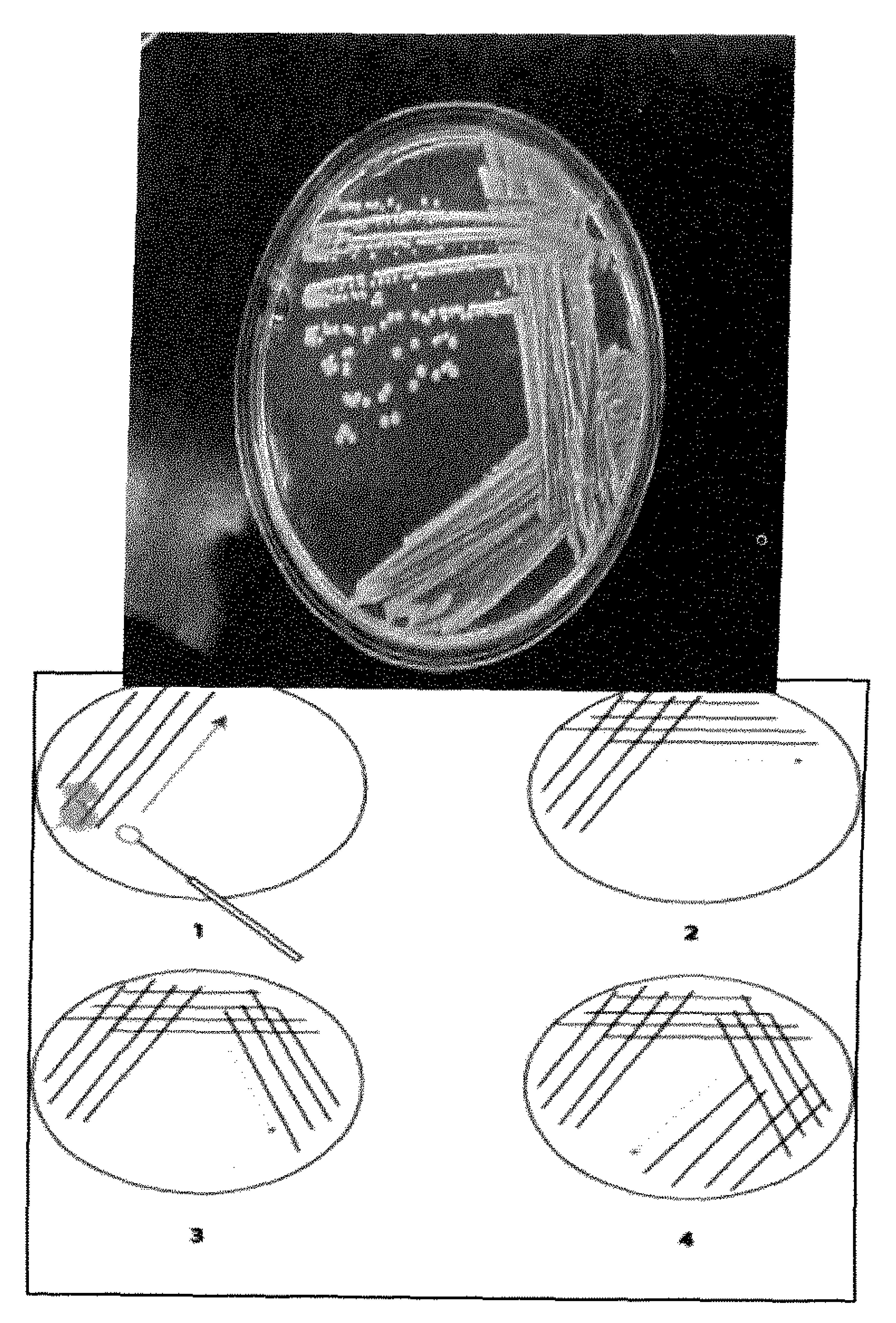
يتم الحصول على مزرعة نقية وذلك بتعقيم إبرة التلقيح ذات عقدة باللهب ثم تبرد بلمس حافة الاكار، ثم تغمس الإبرة في المزروع الجرثومي سائلا كان ام صلبا ، بعدها يتم التخطيط على سطح الاكار مكونة خطا متصلا بشكل الحلزون ، ثم يغطى الطبق بالغطاء .



الشكل (10)عملية الزرع البكتريا بطريقة التخطيط (Streaking) بشكل Zigzag.

الزرع البكتريا بطريقة التخطيط بشكل Crossing shape:

يسمى بطريقة التخطيط المتوازي ويبدأ بعمل عدة خطوط متوازية. ثم تعقم الإبرة باللهب، يلي ذلك عمل عدة خطوط عمودية على مجموعة الخطوط الأولى. تعقم الإبرة ثانية وتكرر العملية. وهكذا نحقق تخفيف المزرعةمن خلال ملاحظة ان تركيز الجراثيم عند نقطة بدء التخطيطهي الاعلى ثم تقل تدريجيا بالابتعاد عنها . بعد الحضن سوف تظهر المستعمرات المعزولة على مسارات بعض الخطوط. الشكل (11)



الشكل (11)عملية الزرع البكتريا بطريقة التخطيط Streaking بشكل Crossing shape .

اسم التجربة :

عزل مزارع نقية من البكتيريا باستخدام طريقة الأطباق المخططة.

الأدوات المستخدمة:

1. أطباق تحتوى على بيئة الآكار المغذى.
2. ابر تلقيح البكتيريا.
3. لهب بنزن.

4. قطن.

5. مادة مطهرة.

طريقة العمل PROCEDURE

1. نستخدم القطن المبلل بالمادة المطهرة لمسح وتطهير الطاولة المخصصة للعمل.

2. شغلي لهب بنزن .

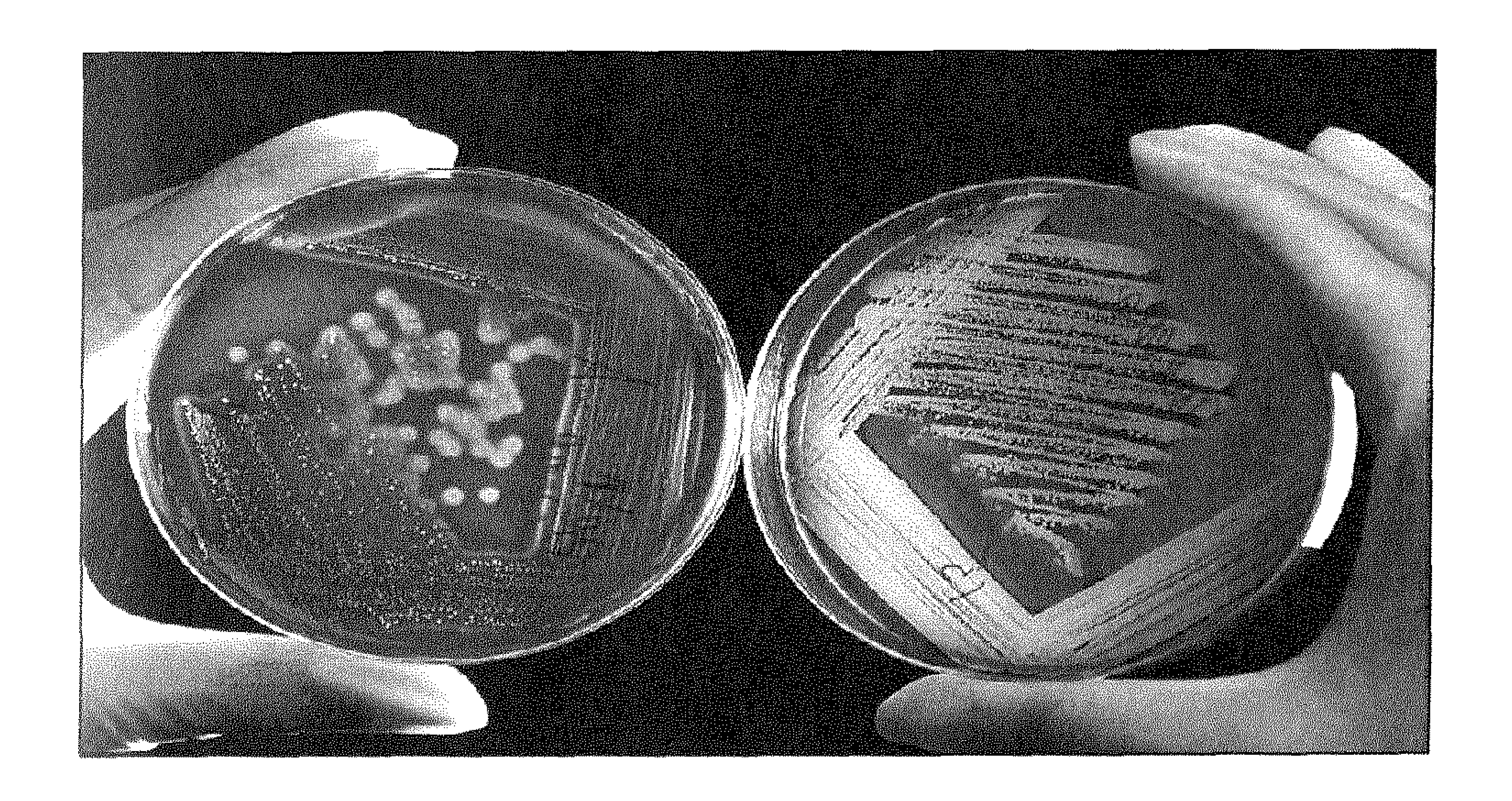
3. ضعي الإبرة على اللهب بوضع راسي حتى درجة الاحمرار ثم برديها على حافة الوسط الزرعي .

4. اختاري من المزرعة البكتيرية الخليطة المعدة للعمل المختبري مستعمرة بكتيرية وخططي بعناية طبقين أحدهما بطريقتي التخطيط .

5. تحضن الأطباق مقلوبة (الغطاء إلى أسفل) على درجة حرارة 37مْ لمدة 24 ساعة.

الغرض من قلب الأطباق: هو تجنب تكاثف الماء على الغطاء من الداخل ثم سقوطه على المجاميع البكتيرية النامية، فيسبب انتشارها وتداخلها مما يصعب عملية الفصل.

6. بعد التحضين افحصي النمو المتكون على سطح الآكار، لاحظي الاختلافات الموجودة بين المستعمرات من حيث الشكل والحجم والمظهر. الشكل (12)



الشكل (12) مزرعة بكتيرية مزروعة بطريقة التخطيط على طبقين زرعيين.

سادسا : طرق حفظ المزارع الميكروبية

(Maintenance of bacterial strains)

هناك عدة طرق لحفظ البكتريا المعزولة بعد تنقيتها لتعريفها ويمكن استخدام هذه البكتريا في الدراسات العلمية الطبية اوالصناعية .يتم حفظ البكتريا بعدة طرق منها :

أولا: طرق الحفظ المزارع البكتيرية لفترات قصيرة :

1) **طريقة حفظ البكتريا باستخدام أنابيب الأكار المائل (Agar Slant):**

وتستخدم أنابيب الآكار المائل لحفظ البكتيريا بعد تلقيحها بالميكروب النقي وتحضينها عند درجة الحرارة المناسبة لمدة 24 ساعة، ثم تحفظ الأنابيب عند درجة حرارة 4مْ .

وتعتبر طريقة الآكار المائل(Agar Slant) التي تستخدم في زراعة الكائنات الدقيقة على المزارع الصلبة من الطرق الشائعة في حفظ المزارع الميكروبية. (Maintaining stock cultures)

وتكون أنبوبة الاختبار المعدة لحفظ البكتريا ذات غطاء وتحتوى على وسط اجار، وضعت على سطح مائل أثناء تبريدها لتجميد الاكار. إن محتويات الأنبوبة المعاملة بهذه الطريقة تتصلب مكونة سطحا مائلا من السهل تلقيحه بإبرة التلقيح .

اسم التجربة :

زرع البكتريا على سطح الاكار المائل .

الأدوات المستخدمة:

1. أنابيب اكار مغذى.
2. حمام مائي .
3. إبرة تلقيح البكتيريا ذات العقدة.
4. بكتيريا *Escherichia coli,*

طريقة العمل PROCEDURE :

1. اذابة ثلاث أنابيب حاوية على الاكار المغذى في حمام مائي على درجة حرارة 100مْ، ثم يتم تبريد تلك الأنابيب على سطح مائل.
2. نزرع سطح اكار الأنبوبة ببكتيريا Escherichia coli الحاوية على الاكار المتصلب باستخدام إبرة التلقيح. حركي الإبرة برفق على سطح الاكار من أسفل إلى أعلى. يجب الحذر من الضغط على الإبرة حتى لا تخدشي الاكار أو تقطعيه.شكل(13)
3. الاحتفاظ بانبوبة ثانية بدون تلقيح لغرض المقارنة.
4. تحضن الأنابيب الثلاثة على درجة حرارة 37مْ لمدة 24- 48 ساعة.
5. افحصي النمو السطحي المتكون ولاحظي طريقة النمو السطحي للبكتيريا على الوسط الزرعي الصلب واللذي يختلف عن النمو في المزرعة السائلة.
6. سجلي النتائج والملاحظات عن التجربة .

مميزات الحفظ في أنابيب الأكار المائل:

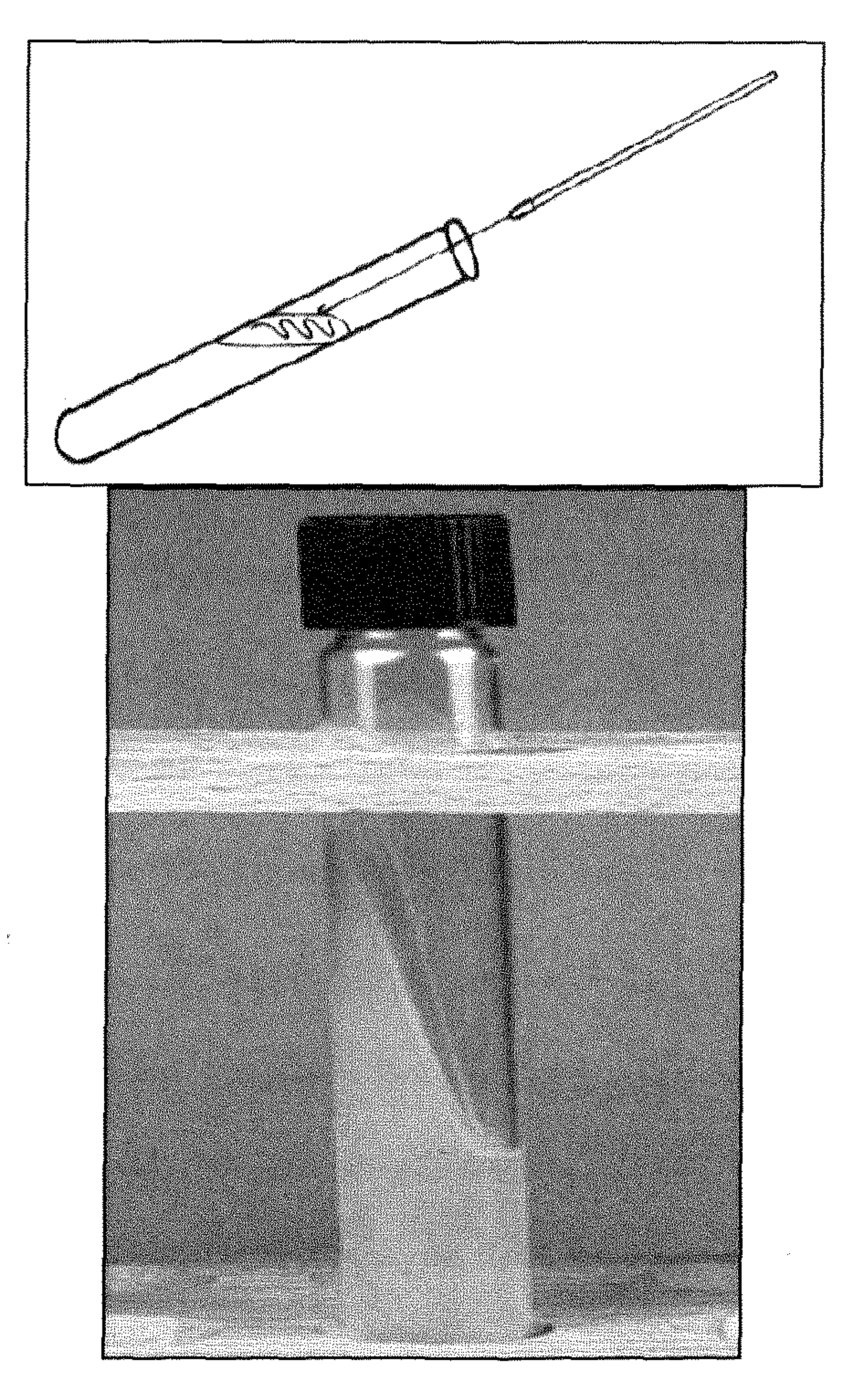
1. فرص التلوث في الأنابيب أقل من الزرع في الاطباق الزرعية.

2. مساحة تهوية في الانابيب الحاوية على الاكار المائل أكبر مما عليه في الأطباق.

3. سهولة التداول والنقل من مكان لاخر.

4. تحتاج الى مساحة صغيرة في الثلاجة.

5. جفاف الوسط في الأنابيب أقل من جفافها في الأطباق الزرعية.



شكل(13) تلقيح سطح الاكار المائل بالبكتيريا.

2) الحفظ باستخدام الكلسرول Glycerol :

يتم حفظ المزارع البكتيرية في محلول معقم من الكلسرين يتراوح تركيزه من 10- 40٪ عند درجة حرارة (- 20مْ). وفى هذه الطريقة يتم تجميع النمو البكتيرى النقى بالإبرة المعقمة ثم يوضع في أنبوبة بها كلسرين معقم وبعض الحبيبات الزجاجية الصغيرة حتى تمنع تكون بلورات ثلجية أثناء الحفظ.

ثانيا: طرق الحفظ لفترات طويلة :

1) الحفظ باستخدام التجفيد Lypholization :

تتم عملية التجفيد باستخدام جهاز (Lypholizer) حيث يوضع الميكروب في أنابيب ذات فوهة كبيرة في الجهاز، ثم يتم سحب الماء تدريجيا تحت التبريد الشديد.و نحصل على الميكروب في صورة بودر.

2) الحفظ باستخدام النيتروجين السائلLiquid nitrogen :

يتم حفظ الميكروب النقي تحت النيتروجين السائل لمنع عملية التلوث، ومن ثم يتم الحفظ عند درجة حرارة(- 20مْ).

3) الحفظ باستخدام التربة المعقمة Sterilized soil :

هذه الطريقه يتم حفظ البكتيريا وخاصة التي تنمو في التربة باستخدام قليل من التربة المعقمة. وفى هذه الطريقة يؤخذ بواسطة الإبرة المعقمة النمو البكتيري النقي ويوضع في أنبوبة تحتوى على القليل من التربة المعقمة، حيث يتم الخلط جيدا تحت ظروف التعقيم ومن ثم الحفظ في درجة

سابعا : الصبغات الميكروبية

MICROBIAL STAINS

هنالك العديد من الصبغات الميكروبية التي تستخدم لاغراض اظهار الكائن الحي المجهري ودراسة اجزاءه وتركيبه عن طريق تلوين الكائنات الحية الدقيقة بصبغات خاصة لتحديد أجزائها المختلفة كالأسواط ،والجراثيم الداخلية ،الغلاف وغيرها، إن أغلب دراسات الأحياء الدقيقة تتم على عينات مصبوغة لتحديد أشكالها العامة أو أجزائها المختلفة .

الصبغة هي مادة ملونة عضوية لها القدرة على الاتحاد مع المواد الأخرى معطية لها اللون **انواع الصبغات اعتمادا على تركيبها الى:**

1. الصبغات الطبيعية وهي التي تنتج طبيعياً ، ويمكن استخلاصها من أنسجة النباتات ، ومن أمثلتها صبغة الهيماتوكسيلين .
2. الصبغات الصناعية وهي وتستخلص من قطران الفحم وهي شائعة الاستخدام في المختبرات البكتريولوجية.

أنواع الصبغات الأكثر استخداما في مجال الدراسات الميكروبية .

أولاً- الصبغات البسيطة Simple stain

يقصد بالصبغ البسيط استخدام صبغة واحدة فقط في صبغ الغشاء البكتيري ، ومن أشهر الصبغات المستعملة فيها صبغة ازرق الميثلين ، السفرانين ، النسيان البنفسجي ، الفوكسين .

ثانياً- الصبغات التفريقيه Differential stain

يعني إستخدام المزايا أكثر من صبغة واحدة ، وذلك للتمييز بين مجموعات بكتيرية مختلفة ، أو للتمييز بين بعض أجزاء ومكونات الخلية البكتيرية نفسها ، ومن أشهر الصبغات التفاضلية ،

- صبغة كرام .
- الصبغة السالبة للكبسولة .
- صبغة الجراثيم .
- صبغة الأسواط .
- الصبغة الصامدة للأحماض .

الصفات الرئيسية لتصبيغ الاحياء المجهرية في المختبرات :

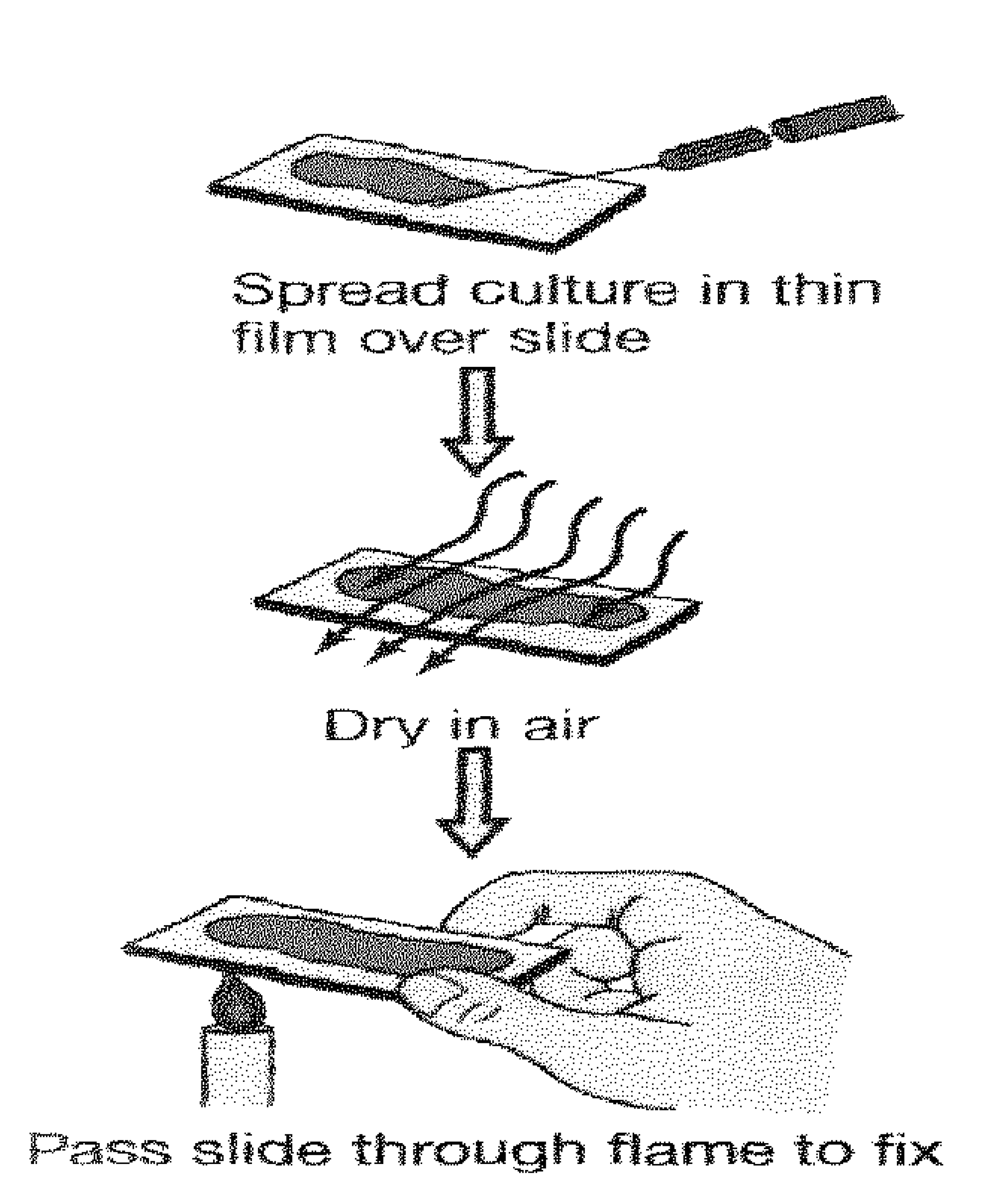
1. توفير التباين بين الكائنات الدقيقة وبين الخلفية الموجودة فيها ، مما يسمح بالتمييز بين الصفات المرفلوجية المختلفة .
2. تسهيل دراسات التركيبات الداخلية للخلايا البكترية ، مثل جدار الخلية ، الفجوات ، الأجسام النووية.

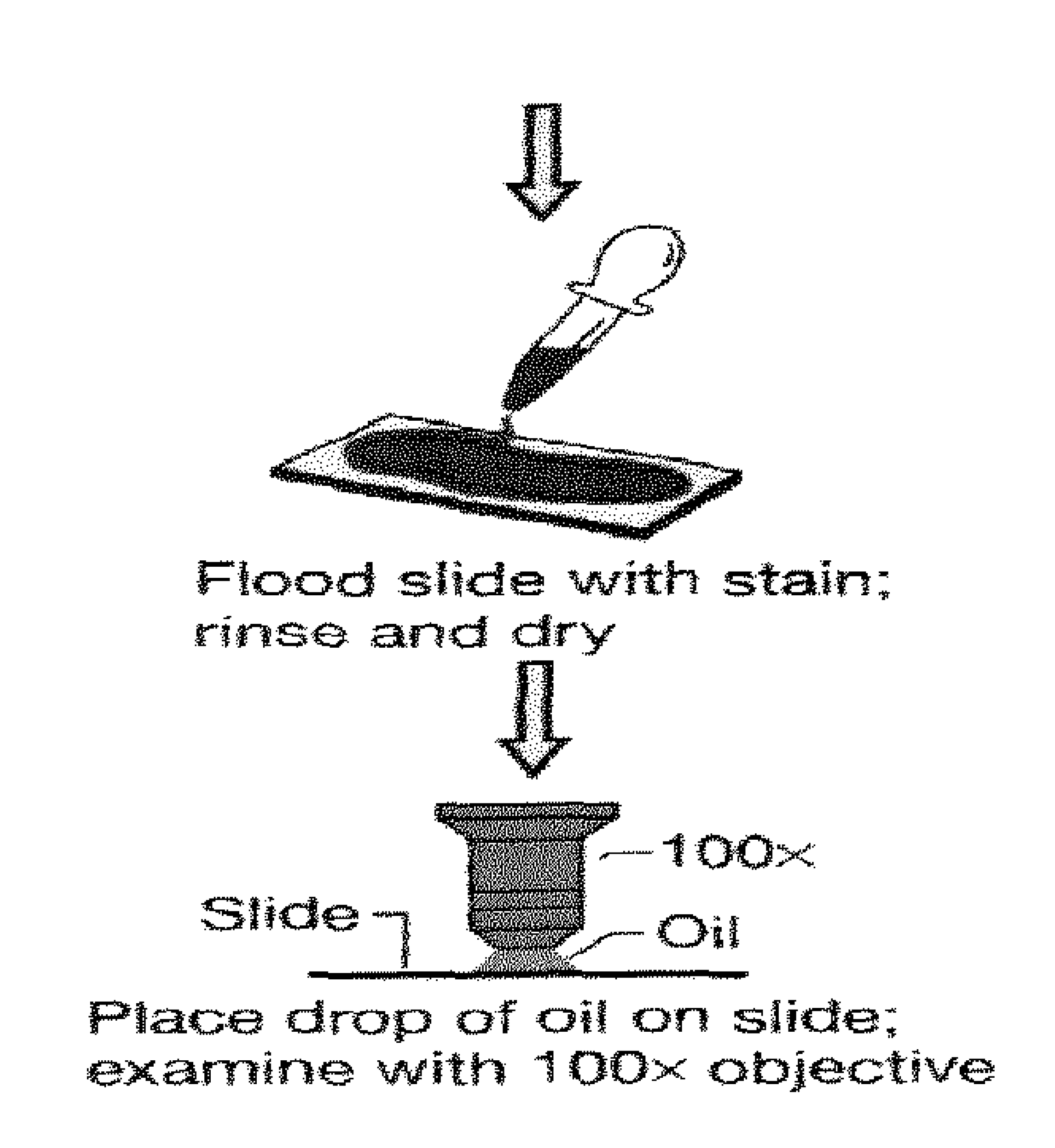
تحضير شريحة زجاجية باستخدام صبغة اكرام :

تعتبر هذه الطريقة من الطرق الاساسية والمعتمده في تحضير الغشاء الجرثومي بمختبرات الاحياء المجهرية وتتم بعدة خطوات هي:

1. نغسل شريحة زجاجية سلايد ون ثم نجففها بتمريرها على اللهب .
2. نضع نقطة ماء لتحطيم الغشاء على سطح السلايد .
3. نعقم الإبر ونأخذ مسحة من المستعمرة.
4. نعمل الغشاء الجرثومي عن طريق وضع ونفرد المسحة على الشريحة الزجاجية.
5. تثبيت الغشاء الجرثومي وذلك بامرار الشريحة على اللهب حتى يجف الماء.

6. نصبغ الغشاء وذلك بغمر الشريحة في صبغة كريستال البنفسجية لمدة دقيقة واحده .**شكل (14)**
7. نغسل الشريحة حيدا بالماء حتى يزول الصبغة الزائدة (كريستال البنفسجية).
8. نضع الشريحة في اليود لمدة دقيقة واحدة (يعتبر مرسخ للصبغة)
9. ثم نغسل بالماء.
10. ثم نغسل الشريحة بالكحول جدا إمالة الشريحة حتى تزول الصبغة:الكحول عامل مزيل للون الصبغة.
11. نغسل بالماء
12. نضع الشريحة على السفرانين : وهي الصبغة المضادة.
13. نغسل بالماء.
14. نجفف بورق الترشيح بالضغط.
15. نجفف على اللهب حتى تجف تماما.
16. نضع نقطة من زيت السدر.
17. نفحص باستخدام الميكروسكوب على قوة 10 حتى نرى الغشاء ثم قوة تكبير 100عدسة زيتية بطريقة ملاصقة للعدسة **شكل 48**
18. ندون النتائج والملاحظات برسم الاشكال المختلفة للبكتريا والتفريق بين البكتريا الموجبة لصبغة كرام والسالبة لصبغة كرام .





شكل (14) طريقة التصبيغ بصبغة كرام .

نظرية صبغة اكرام:

•تعتمد هذه النظرية على النقاط التالية-

1. تختلف البكتيريا لتقبلها الصبغة الرئيسية والصبغة الثانوية.
2. جدار الخلية الموجبة لصبغة كرام؛ أكثر سمكا من جدار خلية البكتيريا السالبة لصبغة كرام ، من حيث التركيب الكيميائي.
3. يحتوي جدار البكتيريا الموجبة لصبغة اكرام ،على طبقة سميكة من بيبتدوجلوكان ، أكثر سمكا من جدار البكتيريا السالبة لصبغة كرام .

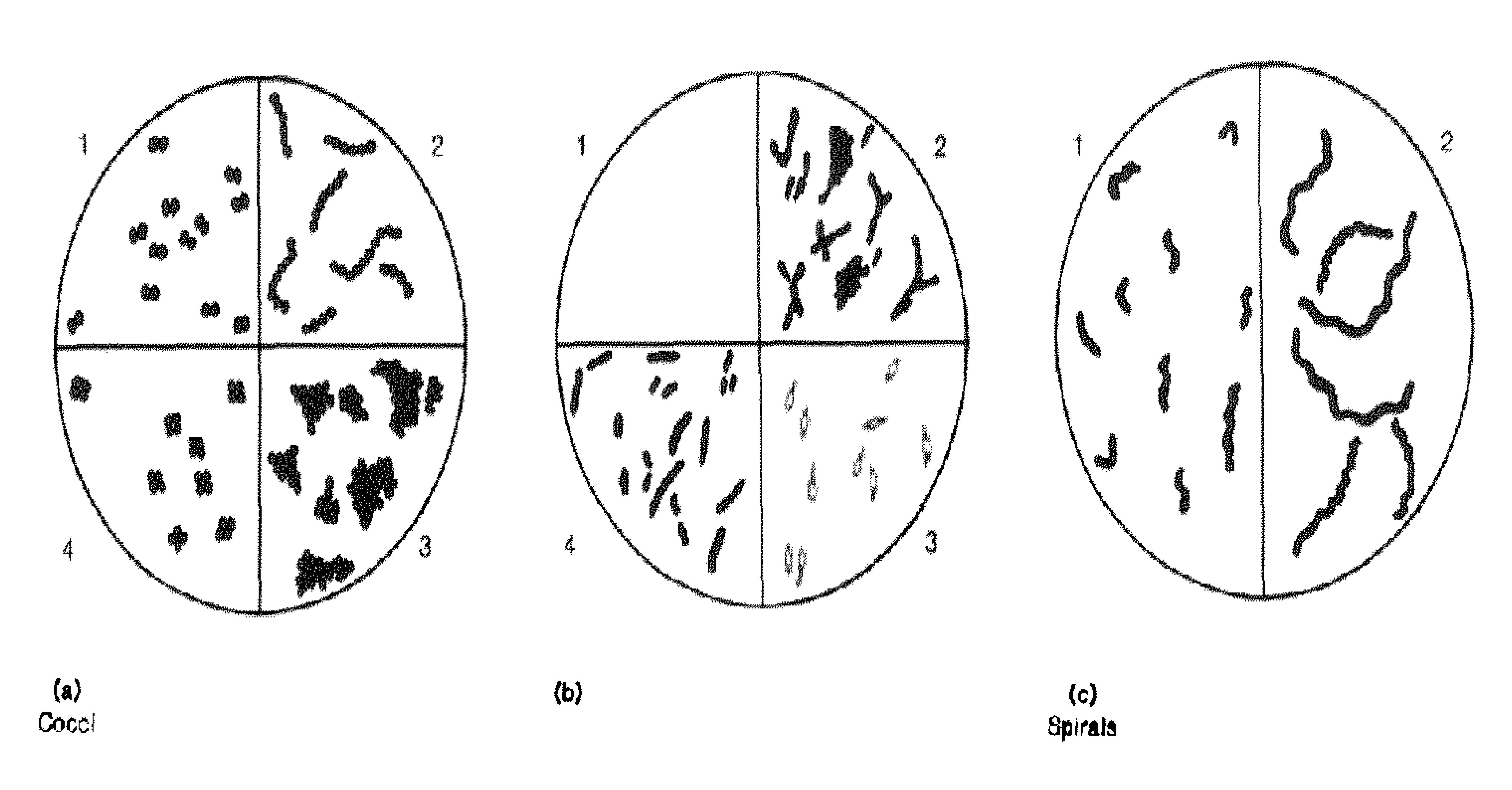
يمكن تفسير آلية الصبغة السالبة أو الموجبة لصبغة اكرام كالتالي:

يحتوي جدار البكتيريا الموجبة لصبغة كرام، على طبقة سميكة من بيبتيدوجلوكان (متعدد السكريات مرتبطة مع البيبتيدات)، التي يسبب لها الكحول إزالة وانكماش جدارها، بحيث يخفض من معدل فقد الصبغة الرئيسية، ومن ثم تصبغ باللون الأساسي البنفسجي.

يحتوي الغشاء الخارجي، لجدار بكتيريا السالبة لصبغة كرام، على طبقات محتوية على البروتين، ومتعدد السكريات ودهون مرتبطة بعديدالسكريات، وطبقة غير سميكة من بيبتيدوجلوكان، محاطة بغشاءخارجي، ومن تم يقوم الكحول بإزالة، أو إذابة الدهون، مما يزيد منفقد الصبغة الأساسية ، ,ويتلون جدارها بلون الصبغة الثانوية(الأحمر.)

من الملاحظات الواجب مراعاتها في تحضير صبغة كرام .

1. يجب تحضير مسحة البكتيرية من بيئة حديثة عمرها أقل من 24 ساعة.
2. تنظف ثلاث شرائح زجاجي تنظيفا جيد.
3. يرسم دائرة على السطح السفلي، على كل شريحة من الشرائح الثلاثة ،مع كتابة أسماء الاوساط على كل منها.
4. ندون النتائج بالرسم لمعرفة اشكال البكتريا ونوعها . **شكل (15).**



شكل (15) اشكال لبكتريا مصبغة بصبغة كرام تظهر تحت المجهر .

الصبغه المقاومه للحامض(Acid-Fast Staining (Ziehl-Neelsen)

تعد هذه الصبغة من الصبغات الاساسية التي تستخدم لتصبيغ الانواع البكتيريه التي لاتصطبغ بالصبغات التقليديه (صبغة كرام) ، من امثلة البكتريا التي يتم تصبيغها ب Acid-Fast Staining هي بكتريا *Mycobacterium* و*Nocardia* .

الأدوات المستخدمة:

1. أطباق تحتوى على وسط الآكار المغذى.
2. ابر تلقيح البكتيريا.
3. نوعين من البكتريا E.coli و Mycobacterium .
4. صفيحه ساخنه (Hot Plate).
5. صبغة Acid-Fast Staining .

طريقة العمل :

1. تحضر عينه بكتيريه مكونه من نوعين احدهما مقاومه للحامض والاخرى غير مقاومه E.coli و Mycobacterium تترك العينه لتجف.
2. يوضع السلايد على صفيحه ساخنه (Hot Plate) ويغطى بورق نشاف بحجم السلايد وبعد ذلك تغمر الورقه بصبغة Carbolfuchsin وتسخن العينه لمدة 3- 5 دقائق (يجب عدم ترك السلايد ليجف كما ينصح بعدم الغمر الكثير بالصبغه، تجنب الغليان).
3. ينقل السلايد بعيدا عن Hot Plate ويترك ليبرد ثم يغسل بالماء لمده 30ثانيه.

4. تقصر الصبغه بواسطة الغسل بالكحول حتى تظهر المسحه باللون الوردي وهذا يحتاج الى 10- 30 ثانيه.
5. تغسل العينه بالماء لمدة 5 ثواني.
6. تصبغ العينه بالصبغه المقارنه (Blue Methylene) ولمدة دقيقتان.
7. تغسل العينه بالماء لمدة 30 ثانيه.
8. يجفف السلايد ورق النشاف.
9. يفحص السلايد بـ Immersion oil.
10. تدون النتائج مع الرسم . **شكل (16)**



شكل (16) بكتريا *Mycobacterium* مصبوغة بصبغة Acid-Fast Staining.

الاختلاف بين البكتيريا المقاومة للاحماض و البكتيريا الغير مقاومة للاحماض

يرجع السبب الاساسي للاختلاف الى وجود تراكيز مرتفعة من الدهون في الاغشية السيتوبلازمية لخلايا البكتيريا المقاومة للاحماض، وهذه الدهون تمنع او تؤخر دخول الصبغة او خروجه.

ويعتقد ان وجود حمض الميكوليك Mycolic acid اما في البكتيريا المقاومة للاحماض بنسبة كبيرة من اسباب ايجابيتها.

تصبيغ الاسواط

السوط (Flagellum) هو عضية الحركة لمعظم أنواع الجراثيم وهناك اختلافات بين أنواع البكتريا من حيث عدد الاسواط وكذلك موقعها.

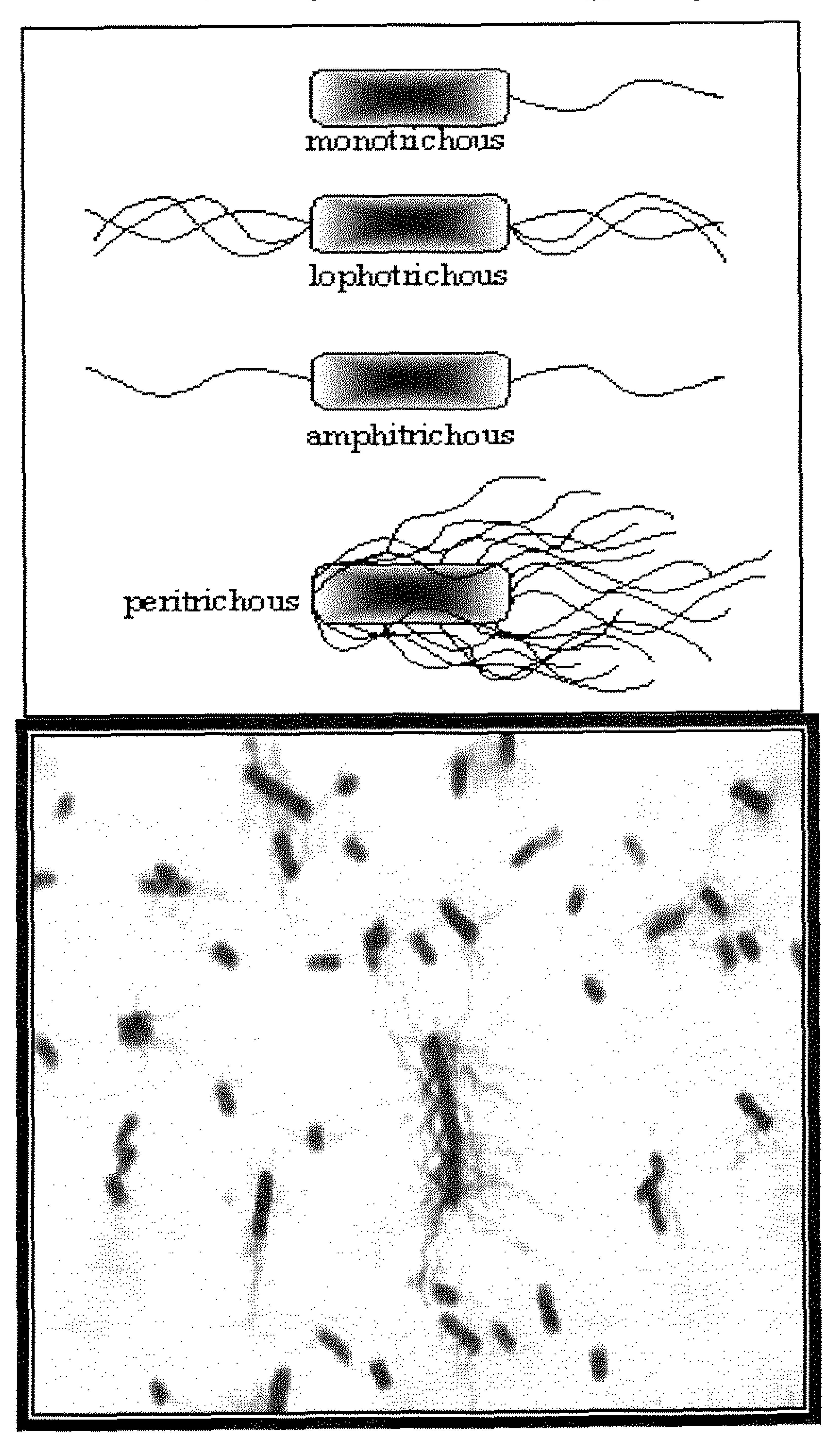
1. فبعض الأنواع البكتريا تمتلك سوطاً واحد وتسمى وحيدة السوط **(Monotrichous)**
2. والبعض البكتريا متعدد الاسواط **Multitrichous** or **Polytrichous** شكل(17)

إما من حيث الترتيب فهي كما يلي:

1. **Lophotrichous**: حزمة من الاسواط في طرف أو طرفي الخلية.
2. **Pertrichous**:الاسواط موزعة حول جدار الخلية من كل الجهات.
3. **Amphitrichous**: سوط طرفي واحد.

ينشأ السوط في السايتوبلازم تدعى **(Blepharoblast)** وأحيانا تفقد الاسواط في بعض الضروب، ولا تنشأ انواع ذات اسواط من جراثيم غير مكونة للاسواط .

إن الاوساط الأكثر ملائمة لوجود الاسواط هي الأوساط السائلة، والسوط لا يمكن تمييزه مجهرياً إلا بواسطة استخدام تقنيات تصبيغ خاصة، حيث يتم ترسيب الصبغة على السوط لزيادة سمكه فيمكن تمييزه.



شكل(17) انواع الاسواط البكتيرية تظهر تحت المجهر .

اسم التجربة:

التحري عن وجود الاسواط في الجراثيم.

المواد المستخدمه:

- مزارع بكترية صلبة لبكتريا *Proteus* , *E*.coli بعمر 18- 24 ساعة.
- مثبت الاسواط (أ) وهو عبارة عن محلول 5- 10٪ حامض التانيك Tannic acid ويحضر مباشرة قبل الاستعمال.
- مثبت الاسواط (ب) ويتكون من خلط المحاليل التالية:
  - ✓ 305 ملليتر من محلول المثبت (أ).
  - ✓ ملليتر من محلول الفوكسين القاعدي الكحولي (Fuchsin Carbol).
  - ✓ 0.5 ملليتر من محلول حامض الهيدركلوريك المركز.
  - ✓ 2 ملليتر من الفورمالين.
- محلول مخفف من صبغة الكاربول فوكسين.
- شرائح زجاجية نظيفة وجافة.

طريقة العمل :

1. يتم اضافة حوالي (2- 3) ملليتر من الماء المقطر المعقم إلى المزرعة الجرثومية واتركها لمدة 30- 60 دقيقة لتتيح الفرصة لانتشار الجراثيم في الماء.
2. انقل قطرة من سطح الماء الحاوي على الخلايا الجرثومية إلى سطح شريحة زجاجية وضع الشريحة بوضع مائل لغرض انحدار القطرة مكونة غشاء، ثم اتركها لتجف بوضعها المائل .

3. أضف المحلول المثبت (أ) واتركه لمدة 5 دقائق.

4. اسكب الفائض من المحلول واغسل الشريحة بالماء.

5. أضف المحلول المثبت (ب) واتركه لمدة (5- 7) دقائق.

6. يزال المحلول المتبقي وذلك بغسل الشريحة بالماء.

7. ضع المحلول المخفف من صبغة الكاربول فوكسين لكمية وافرة على المسحة واتركها لمدة 2- 3 دقيقة.

8. اترك المسحة تجف بالهواء.

9. افحص المسحة مستخدماً العدسة الشيئية الزيتية، دون وارسم ما تشاهده.

10. بعد انتهائك من العمل نظف المجهر والعدسات جيداً. **جدول (1)**

نموذج النتائج:

جدول (1)عدد الاسواط وموقعها لنوعين من البكتريا .

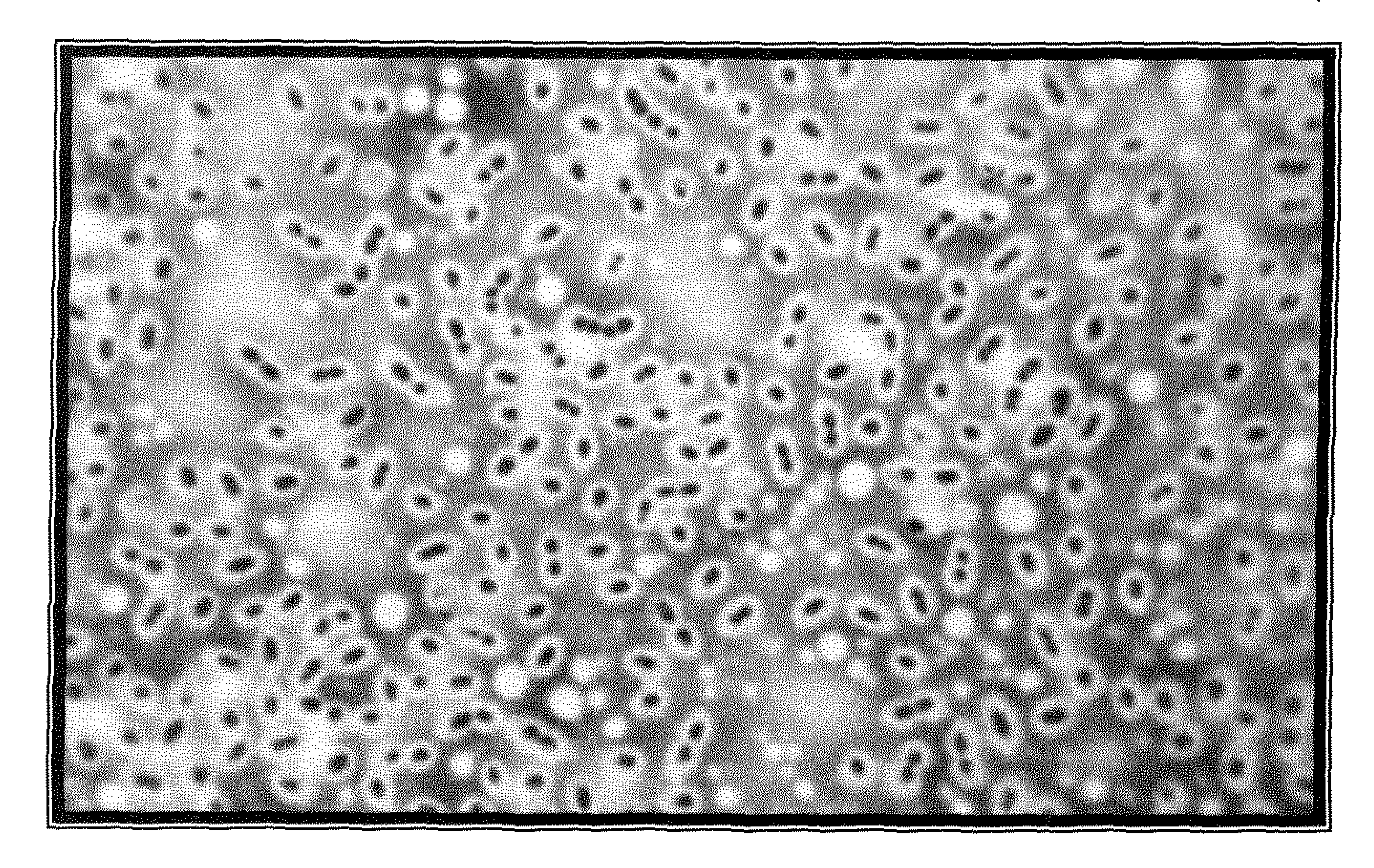
النوع الجرثومي	عدد الاسواط	موقعها	لونها
Proteus vulgaris			
Escherichia coil			

تصبيغ المحفظة (Capsule)

المحفظة هي عبارة عن طبقة سميكة من مادة لزجة صمغية ذات وزن جزيئي عالي تكونها الكثير من الجراثيم عند نموها وهذه المواد اللزجة تتجمع على سطوح الخلايا الجرثومية وتتكون من مادة كربوهيدراتية معقدة وحامض اليورونيك ونادرا ما تحتوي على بروتين وتكمن أهمية المحفظة في حماية ووقاية

الخلية الجرثومية من الظروف غير الملائمة وكذلك فهي أداة لصق للخلية الجرثومية.

تسمى البكتريا التي تكون المحفظة ب (Capsulated) إما تلك التي لا تكون المحفظة فتسمى (Non Capsulated)، وكذلك تتسم المحفظة بكونها مواد متجمعة بشكل منتظم بيضوي أو دائري إما إذا اتخذت تلك التجمعات أشكال غير واضحة المعالم وغير منتظمة فتسمى بالطبقة المخاطية (Slime layer).**شكل (18)**



شكل (18)بكتريا تحتوي على محفظه تحت المجهر الالكتروني.

أهم الأنواع الجرثومية المكونة للعلب هي

Klebsiella pneumonia* ، *Bacillus anthracis* ، *Streptococcus pneumonia

وتعمل العلبة في الأنواع المرضية من الجراثيم كعامل ضراوة مهم حيث تقي الكائن ألمجهري من البلعمة بواسطة كريات الدم البيضاء وتساعد في زيادة الامراضية لتلك الجراثيم. إن صفة تكوين المحفظة هي صفة وراثية، إما سمك

المحفظة فيتحكم به نوع الوسط الزراعي وعمر البكتريا بالإضافة إلى ذلك فان هنالك نوعاً من العلب يصعب رؤيتها بالمجهر الضوئي ويتم التحري عليها باستخدام طرق مصلية (Methods Serological) تدعى مثل هذه العلب بالعلبة أو المحفظة الدقيقة Microcapsule وهي تكون بشكل طبقة دقيقة جداً حول الجدار الخلوي للخلايا الجرثومية المكونة لها.

اسم التجربة:

التحري عن المحفظة في بكتريا *Klebsiella pneumonia*.

المواد المستخدمه:

1. مزرعة جرثومية صلبة لبكتريا *Klebsiella pneumonia* .
2. محلول صبغة البنفسج البلوري .
3. محلول 20٪ كبريتات النحاس
4. صبغة النيكروستين (Nigrosin) أو الحبر الهندي (India Ink) .
5. 5محلول صبغة السفرانين .
6. شرائح زجاجية نظيفة وجافة .

هنالك طريقتين لتصبيغ المحفظة هما:

الطريقة الاولى:

طريقة انثوني Anthony Method المستعملة في تصبيغ بكتريا *Klebsiella pneumonia*:

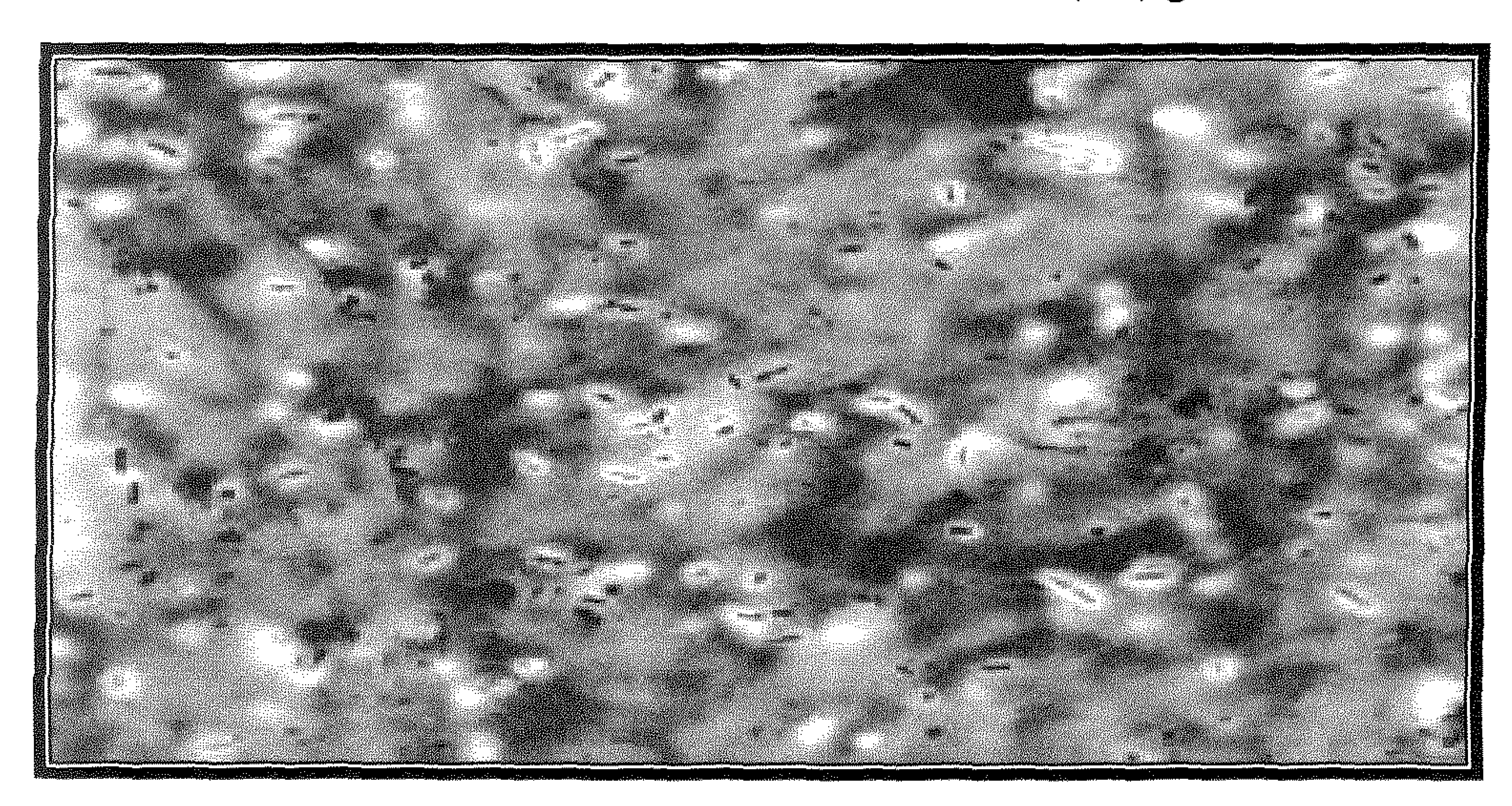
1. حضر الغشاء الجرثومي لبكتريا *K. pneumonia* واتركها لتجف في الهواء .

2. ضع محلول صبغة البنفسج البلوري بكمية وافرة واتركه لمدة (2- 3) دقيقة.

3. اسكب الصبغة واغسل الشريحة بمحلول 20٪ كبريتات النحاس (لا تستعمل الماء في الغسل مطلقاً).

4. اترك الشريحة لتجف في الهواء.

5. افحص بالمجهر الضوئي مستخدماً العدسة الشيئية الزيتية ارسم ودون ما تلاحظ. **شكل (19)**



شكل (19) بكتريا *K. pneumonia* تظهر تحت المجهر الضوئي.

الطريقة الثانية :

طريقة جن (Gins Method) المستعملة في تصبيغ بكتريا *Klebsiella pneumonia*

1. حضر الغشاء الجرثومي لبكتريا *K. pneumonia* من المزرعة الصلبة مستخدماً الحبر الهندي بدلاً من الماء لنشر الخلايا الجرثومية، ثم دع المسحة لتجف وثبتها قليلاً بالحرارة.

2. ضع محلول صبغة السفرانين بكمية وافرة واتركه لمدة (1- 2) دقيقة.

3. اسكب الفائض من الصبغة واترك الشريحة لتجف بالهواء (ولا تستعمل الماء مطلقاً).

4. افحص الشريحة مجهرياً مستخدماً العدسة الشيئية الزيتية، دون وارسم ما تشاهده جدول (2).

5. نظف المجهر والعدسات جيداً بعد الانتهاء من العمل.

نموذج النتائج:

جدول (2) تحضير بكتريا K. pneumonia بطريقتين .

K. pneumonia	طريقة جن	طريقة انثوني
لون الخلايا الجرثومية		
لون المحفظة		
لون الأرضية أو الخلية		

ثامناً : تأثير المواد الكيمائيه على نمو البكتريا

اسم التجربة :

تأثير بعض المواد الكيمائيه على نمو البكتريا

المواد المستخدمه:

1. وسط زرعي لنمو البكتريا .
2. بكتريا E.col.
3. ملقط.
4. المحاليل مثل: نترات الفضة ، كبريتات النحاس ، صبغة كرستال البنفسج ، كحول مركز ومخفف ، كلوريد الزئبقيك.

طريقة العمل :

1. لقحي الوسط الزرعي الحاوي على الآكار المغذي لبكتريا E.coli
2. أقلبي أحد الأطباق ثم قاعدته إلى ثلاث أقسام متساويه .
3. بأستخدام ملقط معقم بالتلهيب الكحولي انقلي قرص صغير من أقراص ورق التشريح ثم اغمسيه في المحلول مثل: نترات الفضة ، كبريتات النحاس ، صبغة كرستال البنفسج ، كحول مركز ومخفف ، كلوريد الزئبقيك. (اتركيه حتى يتشبع) .
4. اخرجي القرص من المحلول وتخلصي من كمية المحلول الزائده وذلك بوضع القرص على ورق ترشيح كبيره معقمه.
5. حضني الأطباق عن درجة 37مئويه لمده 48 ساعه .
6. دوني النتائج والملاحظات .

اسم التجربة:

تأثير بعض المواد الطبيعيه (بصل،ثوم) على فسيولوجيا البكتريا

المواد المستخدمه:

1. وسط زرعي .

2. بكتريا E.col.

3. ملقط.

4. عصير مركز من الثوم او بصل .

طريقة العمل :

1. نزرع بكتريا E.coli على وسط الآكار المغذي.
2. أقلبي أحد الأطباق ثم قاعدته إلى ثلاث أقسام متساويه.
3. بأستخدام ملقط معقم بالتلهيب الكحولي انقلي قرص صغير من أقراص ورق التشريح ثم اغمسيه في المحلول عصير مركز من الثوم أو استخدمي عصير مركز من البصل .
4. اخرجي القرص من المحلول وتخلصي من كمية المحلول الزائده وذلك بوضع القرص على ورق ترشيح كبيره معقمه.
5. حضني الأطباق عن درجة 37مئويه لمده 48 ساعه .
6. بعد انتهاء فترة التحضين دوني نتائجك التي حصلتي عليها .

دراسة تأثير المضادات الحيويه على البكتيريا

طريقة تحضير الأقراص المجهزه :

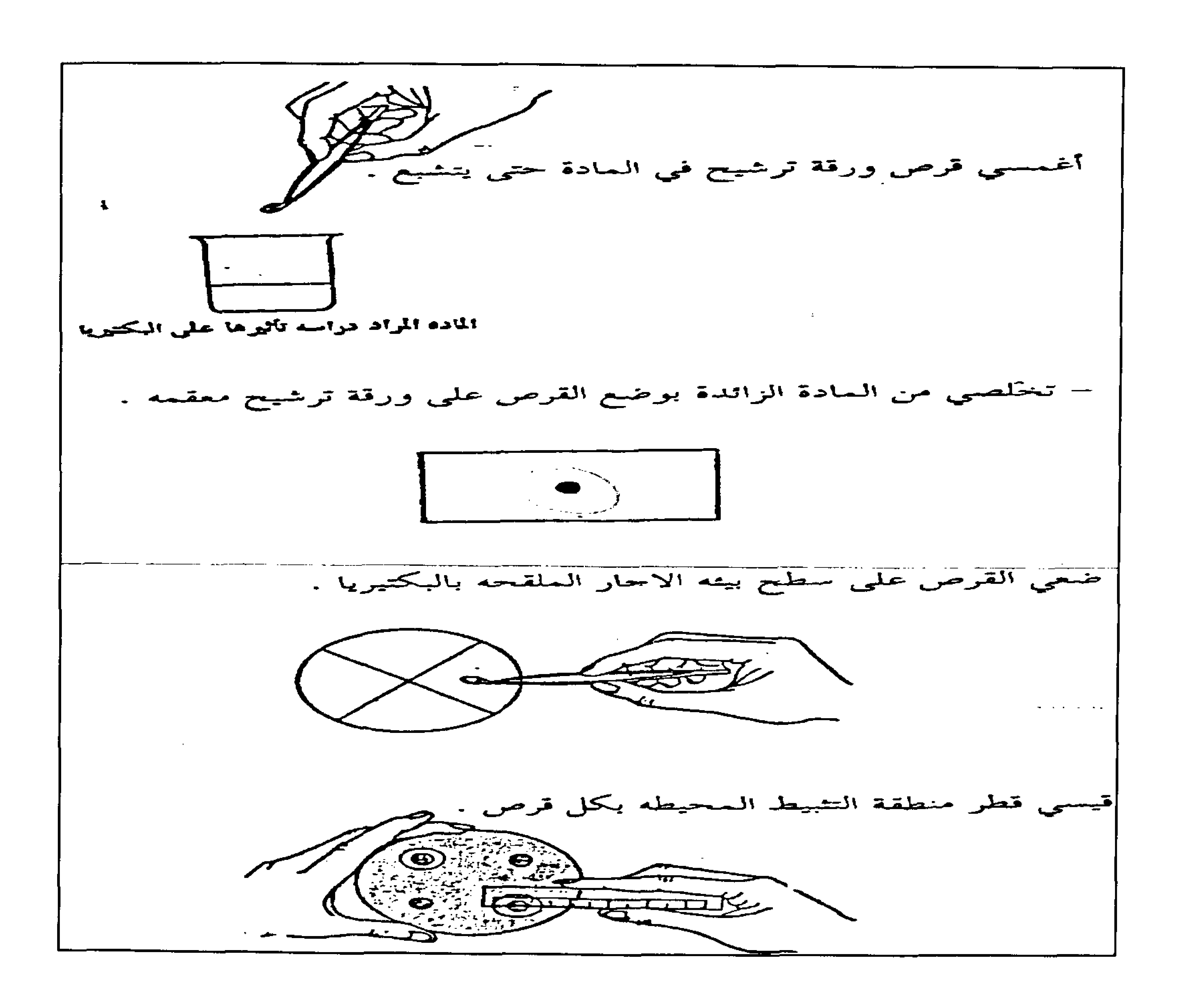
هذه الأقراص تتوفر في الأسواق وهي عباره عن ورق ترشيح تحمل كل منها نوع معين وكمية معلومه من المضاد الحيوي .

المواد المستخدمه:

1. وسط الزرعي .
2. بكتريا E.col.
3. ملقط.
4. أقراص المضادات الحيويه.

طريقة العمل :

1. لقحي الوسط بالبكتيريا بكتريا E.col.
2. بواسطة ملقط معقم بالتلهيب الكحولي انقلي أقراص المضادات الحيويه وضعيها على سطح الوسط الزرعي مع الضغط البسيط على القرص حتى يلتصق بسطح الآ كار.
3. حضني الأطباق عند درجة 37 مئويه لمدة 48 ساعه بعد ذلك افحصيها لتأكد من وجود مناطق خاليه من النمو البكتيري حول القرص ، قيسي قطر تلك المناطق ثم دوني نتائجك في جدول مناسب .
4. من النتائج استنتجي أي المضادات الحيويه المدروسه يعمل بصوره أفضل ضد البكتيريا قيد الدراسه في الغالب يحسب تركيز المضاد الحيوي بالميكروجرام / 1مل . **شكل (20)**



شكل (20) تاثير المضادات الحياتيه على البكتريا .

تاسعاً :الصفات المزرعية لمستعمرات البكتيريا

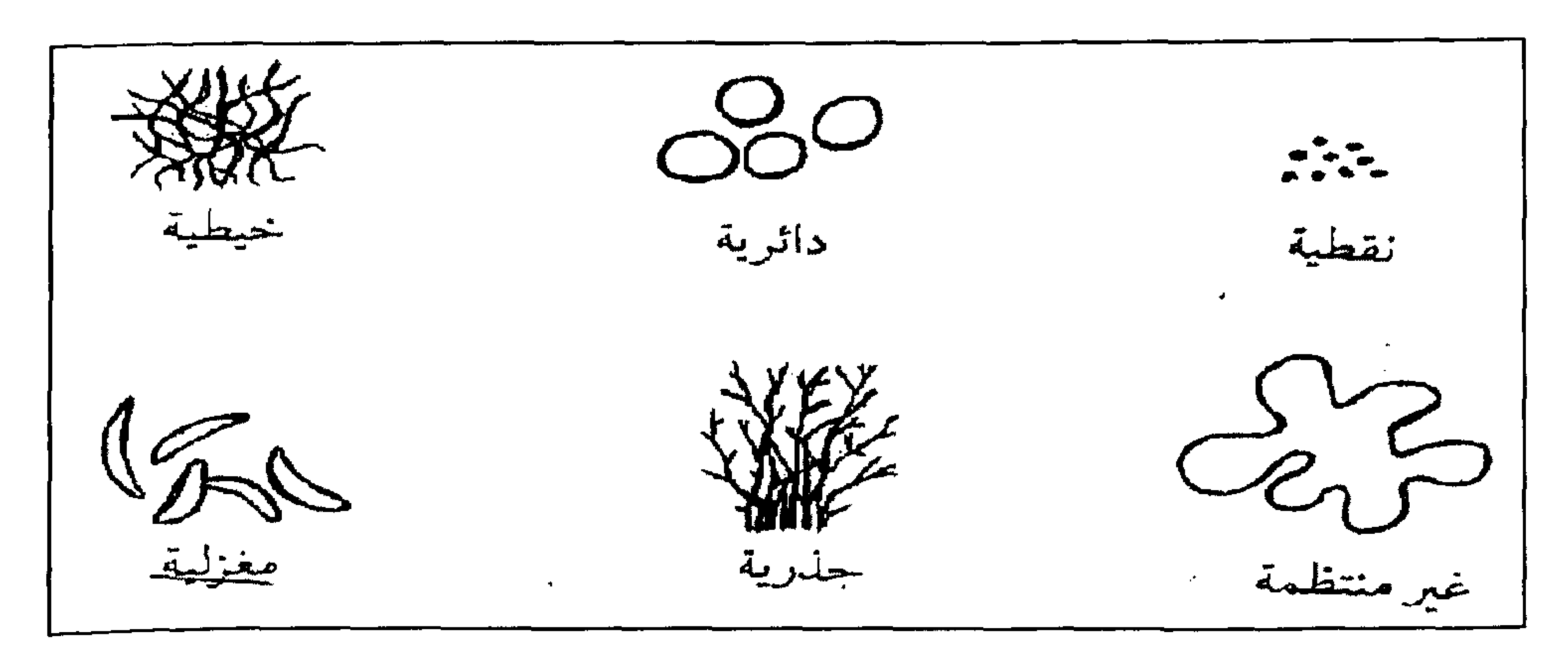
تدرس الصفات المزرعية للاحياء المجهرية وذلك عن طريق دراسة المظهر الخارجي للزرع البكتيري على الطبق والنمو البكتريا على سطح الوسط.

الهدف من دراسة الصفات المزرعية لمستعمرات البكتيريا: هو التعرف على أنواع البكتيريا المختلفة. ويمكن تقسيم الصفات المزرعية للبكتيريا إلى:

أولا :النمو البكتيري على الاوساط الزرعية الصلبة و الصفات المزرعية له:

1. شكل المستعمرة

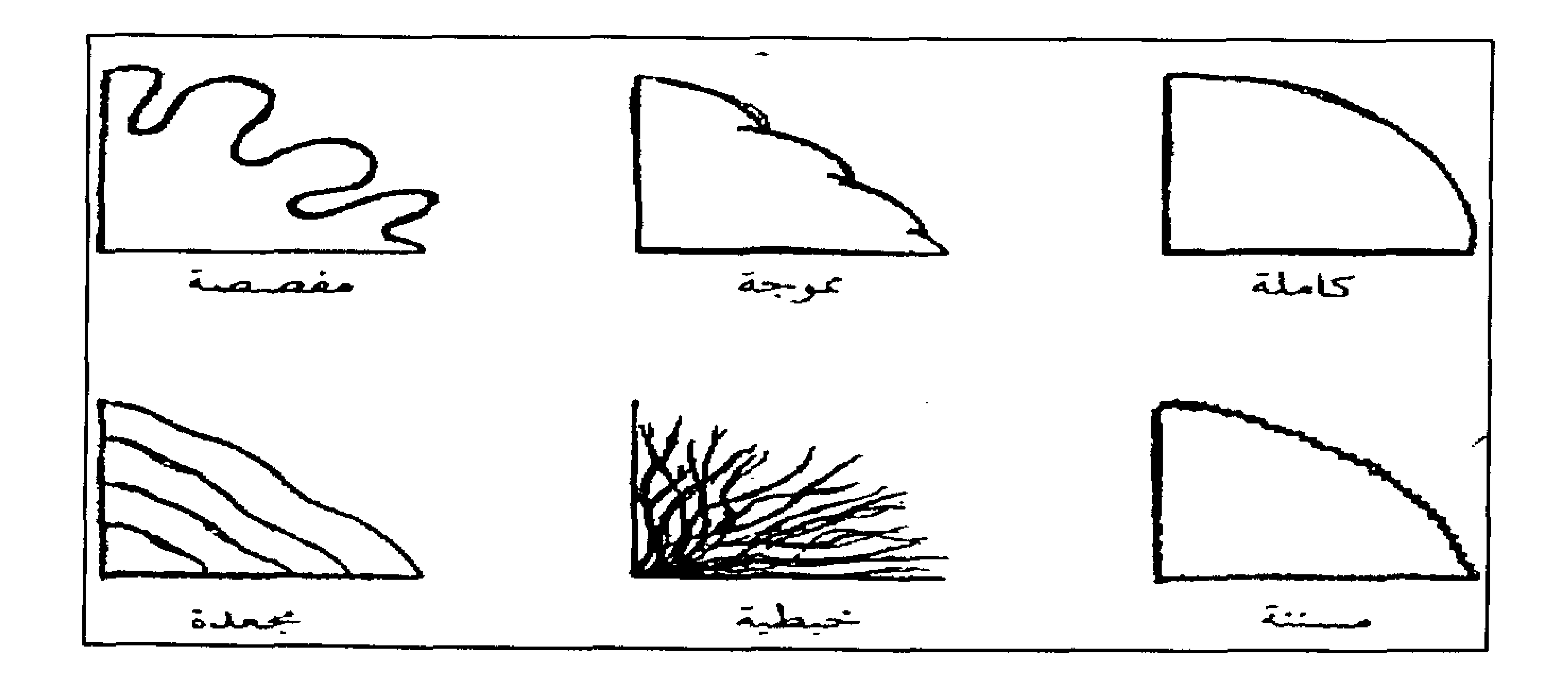
- نقطية
- دائرية
- خيطية
- غير منتظمة
- جذرية
- مغزلية. **شكل (21)**



شكل (21) شكل المستعمرات على البيئة الصلبة .

2. شكل حافة المستعمرة

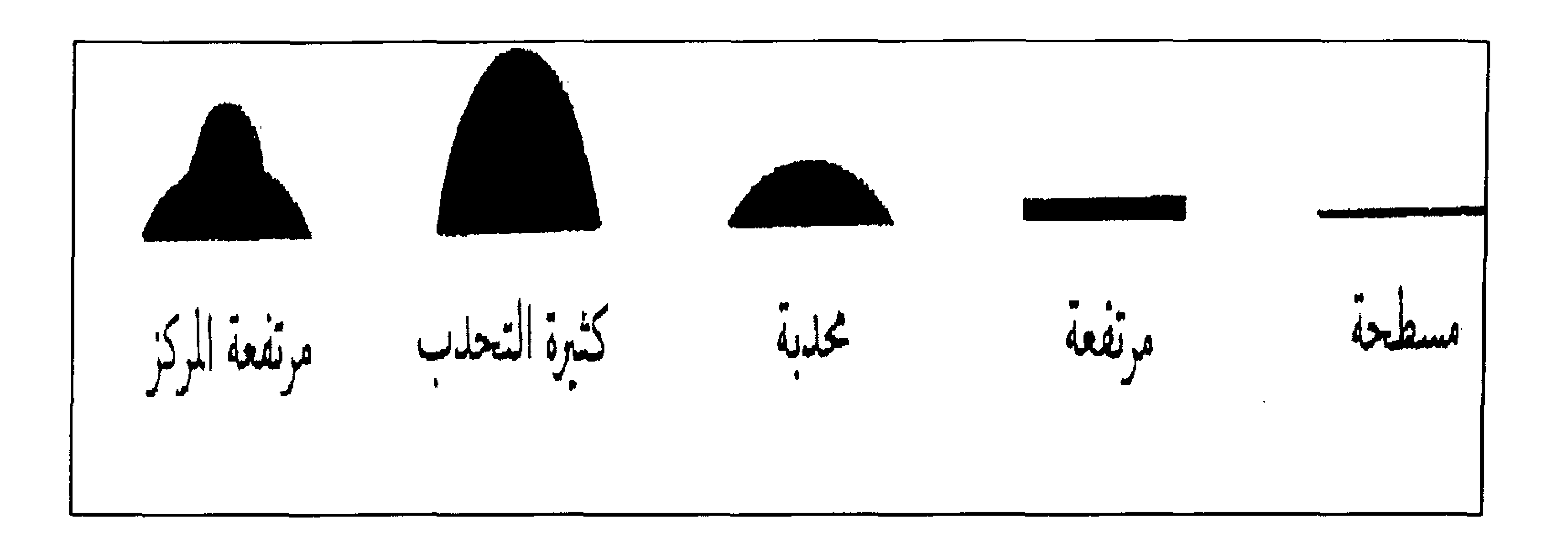
- كاملة
- مموجة
- مفصصة
- مسننة
- مجعدة
- خيطية. شكل (22)



شكل (22) اشكال حافة المستعمرة.

3. ارتفاع المستعمرة

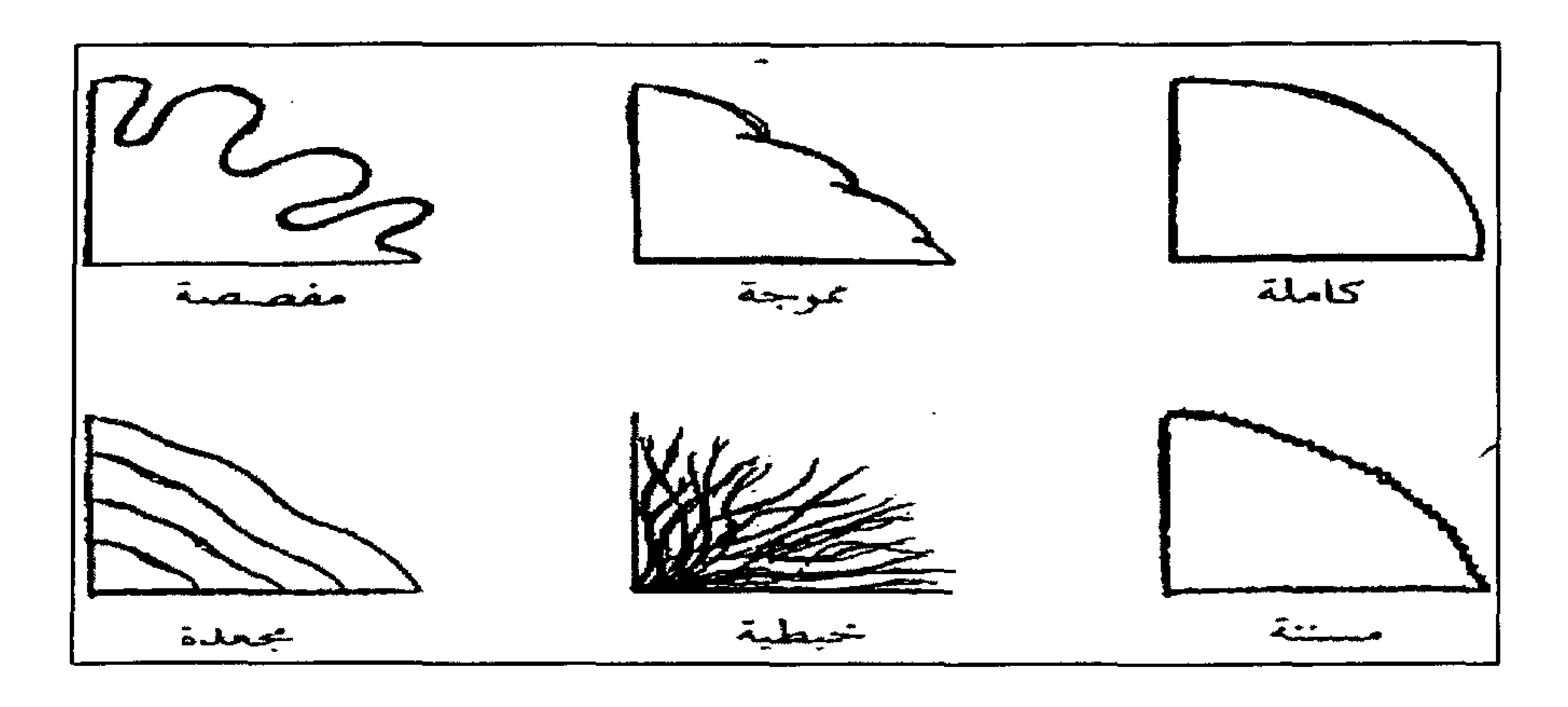
- مسطحة
- مرتفعة
- محدبة
- كثيرة التحدب
- مرتفعة المركز.شكل (23)



شكل (23) انواع ارتفاع المستعمرة على البيئة الصلبة .

3. شكل حافة المستعمرة

- كاملة
- مموجة
- مفصصة
- مسننة
- مجعدة
- خيطية.شكل (23)



شكل (23) اشكال حافة المستعمرة.

4. سطح المستعمرة

- ناعم
- خشن

5. الصفات الضوئية للمستعمرة

- معتمة: لا تسمح للضوء بالمرور خلالها.
- نصف شفافة: تسمح للضوء بالمرور خلالها ولكن لاتسمح بالرؤية الكاملة للأشياء خلفها.

6. قوام المستعمرة

- زبديا
- لزجا
- غشائيا
- هشا

7. لون المستعمرة

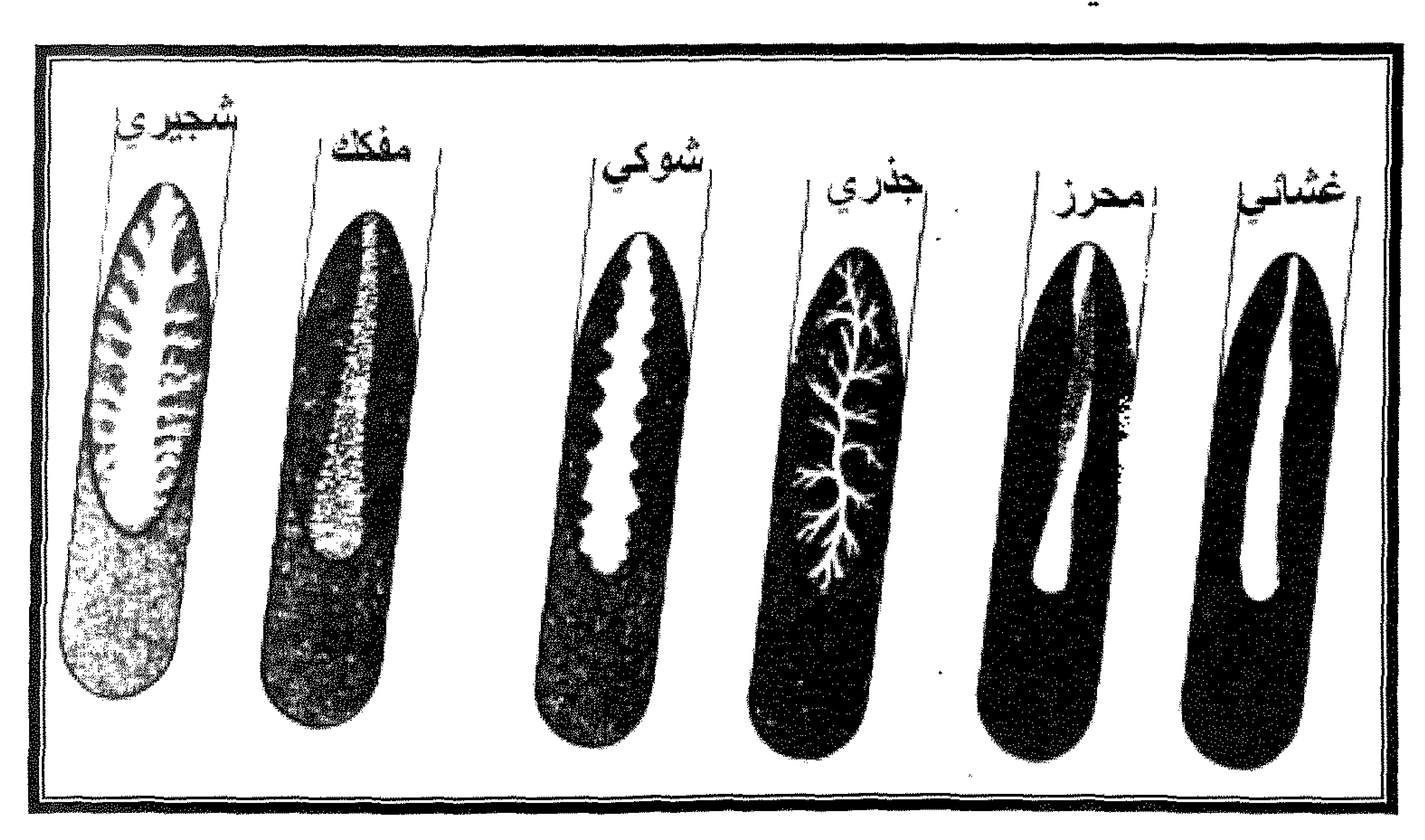
(أ) تفرز بعض البكتيريا صبغات غير ذائبة في الماء تلون المستعمرات ولاتلون الوسط وقد تكون لون المستعمرات أصفر أو أحمر ومن أمثلتها البكتيريا *Xanthomonas* التي تظهر مستعمراتها باللون الأصفر.

(ب) كما تفرز بعض البكتيريا الأخرى صبغات \ائبة في الماء تلون البيئة ولا تلون المستعمرات مثل بعض أنواع الجنس *Pseudomonas* *والتي تفرز صبغة فلوريسينية* ذائبة في الماء لونها أخر مصفر.

ثانيا: وصف النمو البكتيري على بيئة الأكار المغذي المائل

1. شكل النمو

- محزز
- شجري
- غشائي
- جذري
- مفكك
- شوكي. شكل (24).



شكل (24) أشكال مختلفة من النمو على الآكار المائل.

2. كمية النمو البكتيري

- ضئيل
- متوسط

• غزير

3. **الرائحة**

• ليس له رائحة

• اذا وجدت رائحة .

ثالثا: وصف النمو البكتيري في بيئة المرق المغذي

1. **النمو على سطح المنبت**

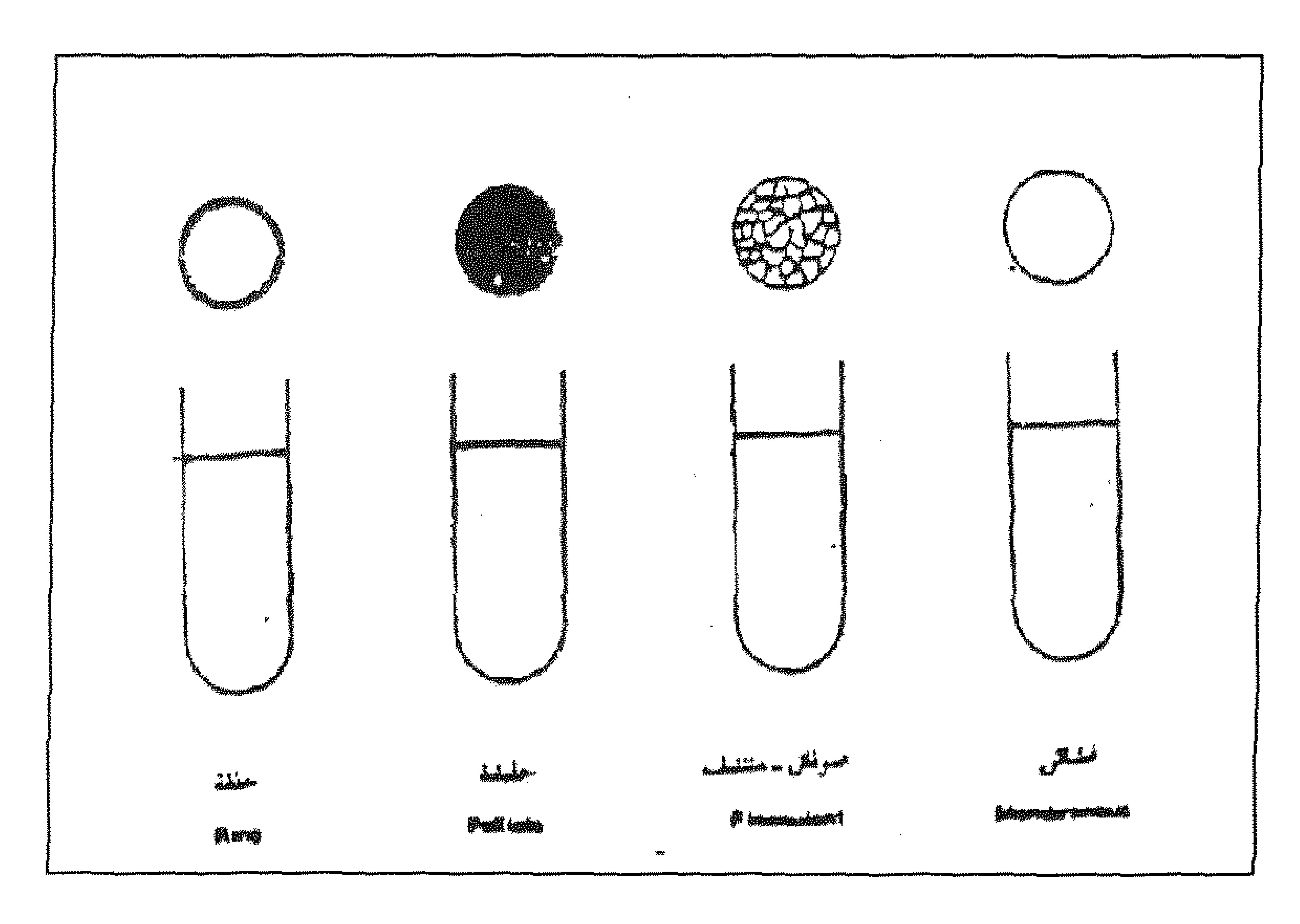
أ- لايوجد نمو سطحي

ب- حلقة محيطة بالسطح

ج- قشرة رقيقة تغطي السطح

د- نمو سطحي متجمع (كتل بكتيرية ملتتصقة ببعضها تطفو على السطح)

ه- نمو غشائي سميك. **شكل (25)**



شكل(25)وصف الزرع البكتيري على سطح المرق المغذي .

2. النمو تحت السطح

- لايوجد نمو
- عكر
- حبيبي

3. النمو المترسب

- لايوجد راسب
- راسب حبيبي
- راسب متكتل
- راسب لزج
- راسب قشري

الخواص المزرعيه لمستعمرات البكتيريا

عمر الزرع : النمو: بطيئ_سريع_متوسط

أولا:وصف النمو البكتيري على بيئه الاكار المغذي

1- شكل المستعمره

- نقطية
- دائريه
- خيطيه
- غير منتظمه
- جذرية
- مغزلية

2_ارتفاع المستعمره

مسطحه ، مرتفعه ، محدبه ، كثيرة التحدب ، مرتفعه المركز

شكل حافة المستعمره

أ- كاملة ب- مموجة ج- مفصصة د- مسننة هـ - مجعدة وخيطية

4_سطح المستعمره

أ- ناعم ب- خشن

5_ الصفات الضوئيه للمستعمرة

أ- معتمة ب- نصف شفافة

6_ قوام المستعمره

أ- زيديا ب- لزجا ج- غشائيا د- هشا

7_لون المستعمرة

ثانيا:وصف النمو البكتيري على بيئه الاكار المغذي المائل

1- كمية النمو البكتيري

أ- ضئيل ب- متوسط ج- غزير

2_شكل النمو

أ- محزز ب- شجري ج- غشائي د- جذري هـ - مفكك و- شوكي

3_ الرائحة

أ- ليس له رائحة

ب- اذاوجدت رائحه يذكر مدى تشابهها لأي روائح معروفة

ثالثا:وصف النمو البكتيري في بيئه المرق المغذي

1_النمو على سطح المنبت

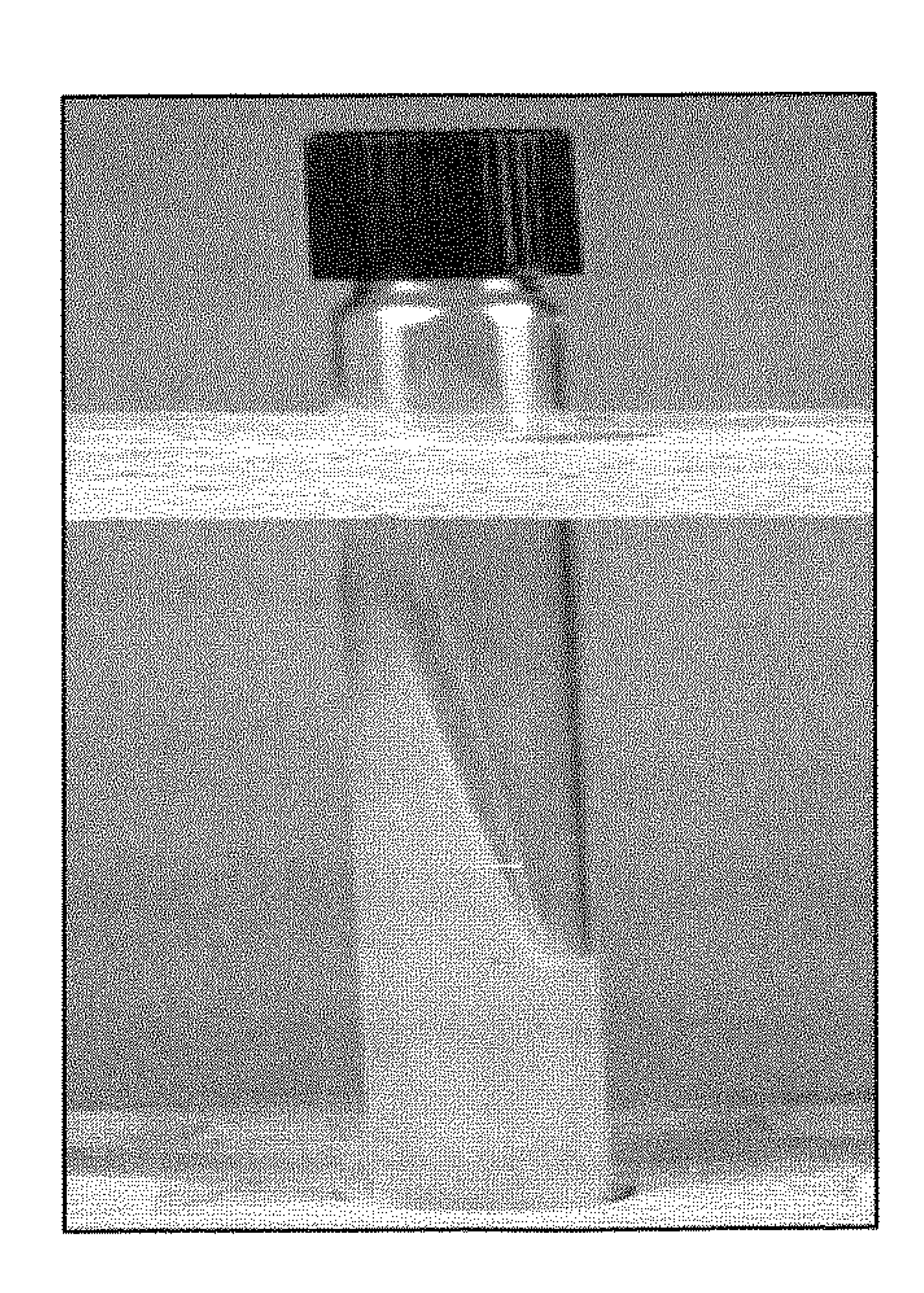
- لايوجد نمو سطحي
- حلقه محيطة بالسطح
- قشرة رقيقه تغطي السطح
- نمو سطحي متجمع(كتل بكتيريه ملتصقه ببعضها تطفو على السطح)
- نمو غشائي سميك.**شكل (26)**

2_النمو تحت السطح

أ- لايوجد نمو ب- عكر ج- حبيبي

3_النمو المترسب

- لايوجد راسب
- راسب حبيبي
- راسب متكتل
- راسب لزج
- راسب قشري



شكل (26)طريقة تلقيح الآكار المائل

عاشراً: حساب عدد الخلايا البكتيرية او العدّ البكتيري :

تعد هذه الطريقة من الطرق المهمه في الدراسات الاساسية والتطبيقية من خلال التقدير الكمي للبكتريا ، وان كمية النمو البكتيري يعد اساسا لتقدير تاثير المعاملات الفيزياويه والكيمياويه على نمو وتكاثر البكتريا كما تستخدم في التقدير الحيوي للفيتامينات والاحماض الامينيه في قياس نشاط البكتريا في احداث التغيرات الكيمياويه وتختلف طريقة التقدير مابين العينات فلكل عينه انواع مايكروبيه معينه كما تختلف العينات في محتواها العددي من الاحياء المجهرية وهذا الاختلاف يكون جوهريا.

ان العدد البكتيري يحدد في المختبرات الاحياء المجهرية بعدة طرق هي اما بطرق مباشره بواسطة المجهر او غير مباشره بواسطة عد المستعمرات الناميه على وسط زرعي صلب.

1. الطرق المباشره :

وتعد طريقة مهمة وسهلة تتم عن طريق حساب عدد الخلايا البكتيريه سواء كانت حيه او ميته ويتم ذلك بالطرق التاليه:

طريقة بريد Breed Method

تتم بنشر مامقداره (0.01) مل من السائل المراد عد البكتريا فيه على شريحة زجاجية تنشر نشر متجانس على مساحة 1سنتمتر مربع ثم يثبت بالحرارة ويصبغ باحد الصبغات البسيطة ثم يفحص تحت المجهر ويحسب عدد البكتريا حسب المعادلة :

العدد الكلي للبكتريا في 1مل = معدل عدد الخلايا في كل حقل×عدد الحقول في 1سنتمتر مربع ×100

طريقة شريحة العد Counting Chamber

تستخدم في هذه الطريقة السلايد المسمى Heamocytometer slide وهي عبارة عن شريحة مقسمة الى مربعات صغيرة مساحة كل منها 400/1 ملم^2 . حيث يكون مركز الشريحه مقسم الى 25 مربع كبير يحوي كل مربع كبير على 16 مربع صغير لذا ان مجموع المربعات هو 400 مربع صغير مغطى بشرائح زجاجيه يرتفع بمقدار 50/1ملم. يتم حساب البكتريا فيها بعد اخذ حجم معلوم من التخفيف المناسب للعينة وحساب البكتيا حسب المعادلة :

عدد البكتريا في 1مل = معدل عدد البكتريا في المربع الواحد ×معامل شريحة العد×مقلوب التخفيف

2.الطرق الغير المباشره

تتم هذه الطريقة باستخدام اطباق مزروعةحيث يتم حساب اعداد الخلايا الحيه الموجوده في العينه الاصليه وتحسب اعداد الخلايا . ان هذه التقنيه تعتمد اساسا على ان كل بكتريا تنمو مكونه كتلة حيه من الخلايا البكتيريه (مستعمره) اي ان بكتريا واحده ينمو منها مستعمره واحده.

الترشيح بالاغشية Membrane Filtration

ترشح الاوساط والاغذية السائلة من خلال مرشحات خاصة ثم يزرع المرشح على وسط ملائم لنمو البكتريا المراد عدها ويحضن في الظروف الملائمة للنمو ثم يحسب عدد المستعمرات النامية على السطح. حيث لايسمح بمرور اصغر انواع الخلايا.

طريقة العد بالاطباق Plate Count

وهي طريقة بسيطة يقاس فيها البكتريا الحية فقط ويكون العد فيها تقريبي فوائد هذه الطريقة هي لمعرفة نسبة التلوث الموجودة في العينات معرفة ومصدر التلوث تفيد في تحديد دقة المعاملات تتم طريقة العد بالاطباق بطريقتين:

◆الصب بالاطباقPlate Pour

تتم بصب 1مل من التخفيف الملائم للغذاء ثم يصب الوسط الزرعي وتحضن الاطباق وبعد انتهاء مدة الحضن تعد الاطباق التي تتراوح فيها من 30- 300 مستعمرة. .

◆النشر السطحي Plating Spread Surface or

يتم في هذه الطريقة تحضير وسط زرعي صلب مثل Nutrient agar وAgar Salt Mannitol ويجفف سطحه ثم ينقل (0.1) من التخفيف الغذائي ثم ينشر على السطح بواسطة قضيب زجاجي ملتوي معقم يشبه حرف L ، تستخدم لدراسة و عد بكتريا العنقوديات الذهبية على الاوساط الصلبة.

اسم التجربة :-

التقدير الغير مباشر لعدد الخلايا البكتيرية .

الهدف من التجربة : تقدير عدد الخلايا الحية القادرة على النمو والتكاثر تحت الظروف المناسبة لنموها بطريقة العد بالأطباق Plate Count method.

المواد المستخدمه:

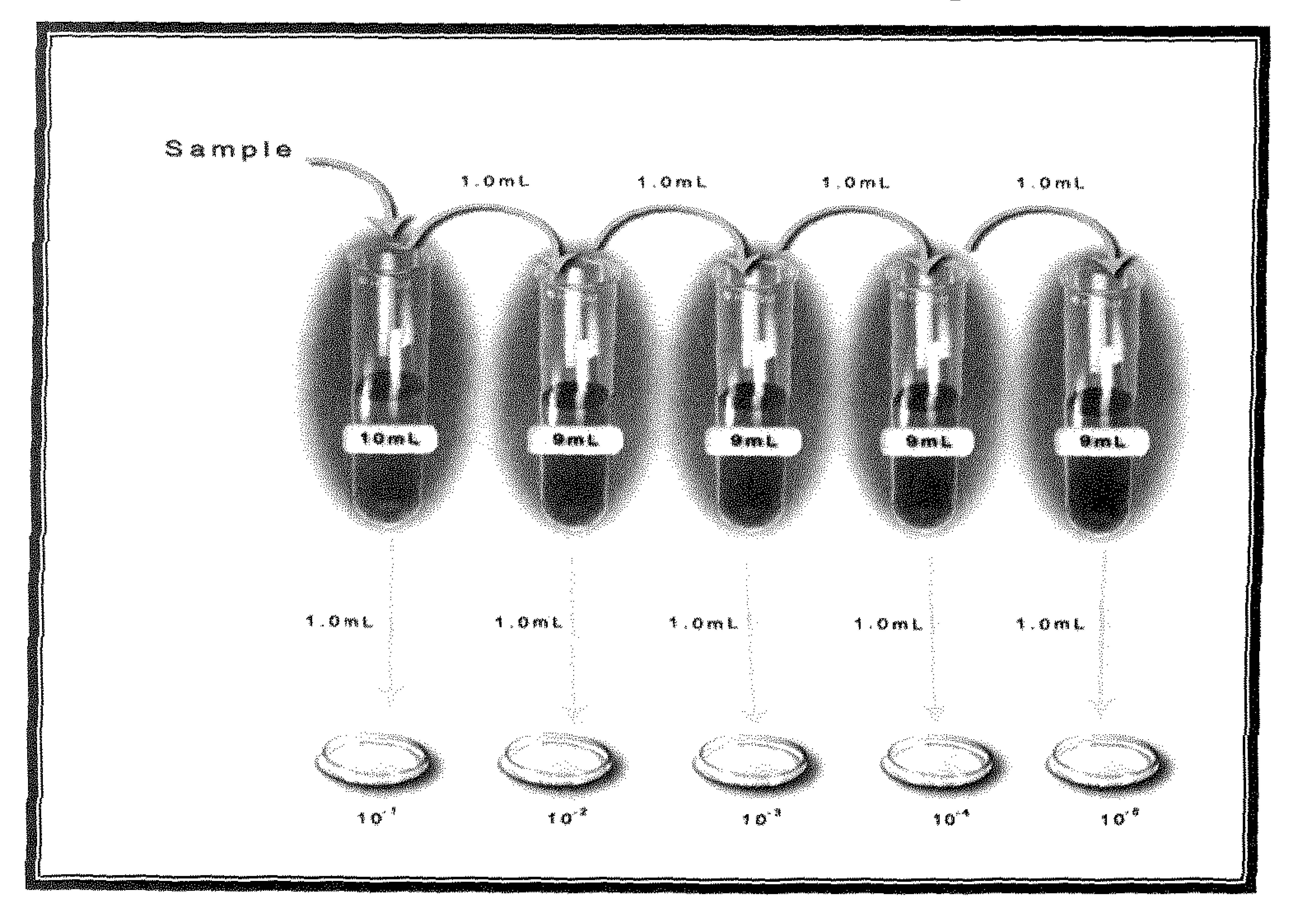
1. المرق المغذي.
2. الاطباق.
3. انابيب اختبار.
4. ماصات.

طريقة العمل :

1. نعقم مكان العمل جيدا بالكحول اواي مادة معقمه ثم ترج المزرعة البكتيرية النامية على المرق المغذي جيدا قبل الاستعمال.
2. نحضر انبوبة اختبار حاوية على 9 مل ماء معقم ثم ينقل 1 مل من المزرعة الى انبوبة بواسطة ماصة معقمة (تخفيف 1:10).
3. ينقل من الأنبوبة السابقة 1مل بواسطة ماصة معقمة أخرى إلى انبوبة بها 9مل ماء معقم وترج الأنبوبة (تخفيف 1:100).
4. تكرر الخطوة السابقة عدة مرات للحصول على تخفيفات تصل الى 1: 1000000 .
5. ينقل 1مل من التخفيفات الثلاثة الأخيرة الى طبق بتري معقم (طبقين لكل تخفيف).
6. لكل طبق يضاف كمية مناسبة من وسط الاكار المغذي السائل والمبردة الى 45م ويحرك الطبق.
7. تترك الاطباق حتى يتصلب الوسط ثم توضع مقلوبة في الحضان عند 37م لمدة 24ساعة.
8. يتم اختيار التخفيف المناسب الذي يظهر به عدد المستعمرات يتراوح بين 30- 300 مستعمرة بالطبق الواحد .
9. يحسب عدد الخلايا الحية في 1مل من المزرعة الاصلية بضرب متوسط عدد المستعمرات في الطبق في مقلوب التخفيف المستعمل.شكل (27)

عدد الخلايا الحية في 1مل= متوسط عدد المستعمرات في الطبق ◆ مقلوب التخفيف المستعمل.

10. تدوين النتائج والملاحظات.



الشكل (27) تقدير عدد الخلايا الحية بطريقة العد بالأطباق Plate Count method

حادي عشر :الاختبارات البايوكيميائية والتفريقية المستخدمة في مختبرات الاحياء المجهرية .

اسم التجربة :-

اختبار تحلل التربتوفان(Tryptophan Hydrolysis (Indole .

الهدف من التجربة :-

تشخيص بكتريا *E .coli* عن الانواع البكتيريه المعويه الاخرى.

تمتاز بكتريا *E .coli* عن الانواع البكتيرية الاخرى بقابليتها على شطر الحامض الاميني التربتوفان الى مكونين هما الاندول Indole و الحامض البايروفي Pyruvic acid والانزيم المسؤول عن عمليه التحلل هذه هو التربتوفاينيز Tryptophanase. يمكن تشخيص الاندول بسهوله بواسطة كاشف كوفاكس Kovacs' reagent. يستخدم ماء البيتون Peptone Water او Tryptone broth (1%) في هذا الفحص لاحتوائهما على كميه كبيره من Tryptophan. البيتون يشتق من كازائين مهضوم بواسطة عصارة البنكرياس.

المواد المستخدمة :

1. كاشف الكوفاكس Kovacs' Reagent.
2. وسط المرق المغذي Tryptone broth or Peptone water .
3. مزرع حديثة لبكتريا E. coli .

طريقة العمل :

1. نعقم مكان العمل جيدا بالكحول اواي مادة معقمه .

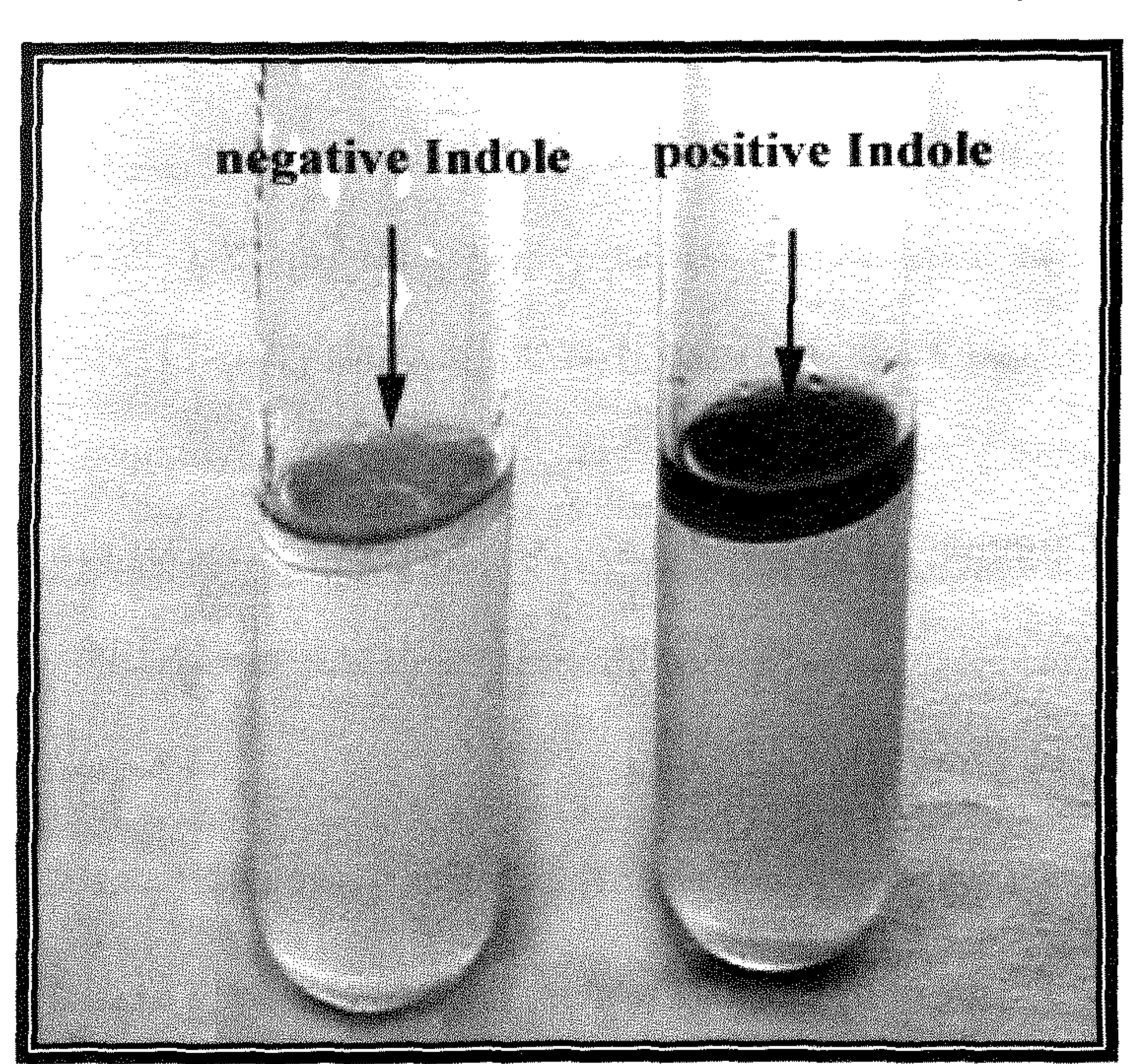
2. نزرع الوسط ببكتريا E. coli.

3. يحضن الانابيب المزروعة لمدة 24 ساعه بدرجة 37م.

4. لغرض فحص الاندول يضاف للبروث الملقح 10- 12 قطره من كاشف كوفاكس Kovacs' reagent.

5. تدون الملاحظات والنتائج. جدول (2)

❖ ان تكوين حلقه حمراء على الطبقه العليا من الانبوبه دليل على الفحص الايجابي للاندول شكل (28)



شكل (28)اختبار الاندول 1- الفحص الموجب 2- فحص السالب.

نموذج النتائج:

جدول (2) يبين اختبار الاندول لانواع من البكتريا المعوية على وسط

. Peptone water Tryptone

النوع الجرثومي	نتيجة الاختبار
Escherichia coil	
Salmonella	

اسم التجربة :-

اختبار تخمر السكريات المختلطه(Methyl-Red Mixed Acid Fermentation لانواع من البكترية المعوية.

الهدف من التجربة :-

تفريق بعض البكتريا المعوية عن طريق معرفة قابليتها لتخمر السكريات

العديد من البكتريا المعويه (سالبة الكرام خصوصا)، يمكن تفريقها عن بعضها بواسطة الناتج النهائي لعملية الايض الخاصه بها عندما تستهلك الكلوكوز (تخمره) على وسط Methyl Red and Voges-Proskauer (MR-VP). بعض الانواع البكتيريه مثل *Escherichia*، *Salmonella*، *Proteus* و *Aeromonas* تخمر الكلوكوز لتنتج كميات كبيره من حامض اللاكتك Lactic Acid ، حامض السكسنيت Succinic Acid و حامض الفورميك Formic Acid بالاضافه الى CO_2 ، H_2 و الايثانول Ethanol. تجمع هذه النواتج تؤدي الى خفض الـ pH للوسط الى مادون الـ(5). اذا ما اضيف المثيل الاحمر الى هكذا وسط (ذو حامضيه مرتفعه) سيتكون لون احمر (لون الدليل المثيلي)، فنستنتج بان الكائن المجهري

النامي في الوسط هو مخمر لحوامض مختلطه (Mixed Acid Fermenter). تعتبر الاحياء المجهريه المخمره للحواض المختلطه عموما منتجه للغاز وذلك بسبب انتاجها لانزيم Hydrogenylase formic والذي يقوم بشطر حامض الفورميك الى جزئين متساويين من CO_2 ، H_2.**شكل (29)**

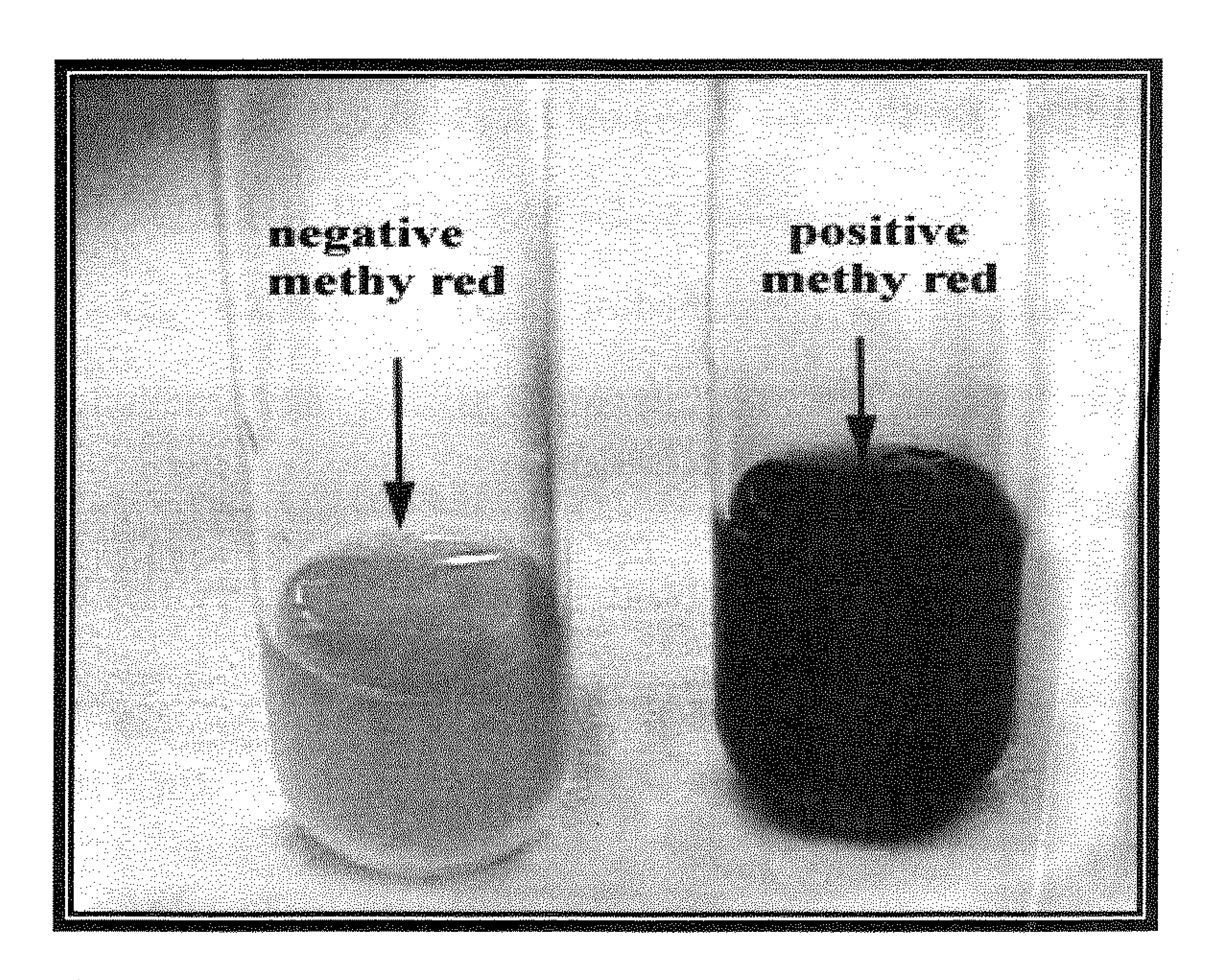
المواد المستخدمة :

1. وسط المرق المغذي MR-VP broth.
2. مزرعة لبكتريا E. coli and Klebsiella حديثة .
3. كاشف المثيلMethyl-Red Indicator .

طريقة العمل :

1. نعقم مكان العمل جيدا بالكحول اواي مادة معقمه .
2. نلقح انابيب حاوية على وسط MR-VP broth ببكتريا E. coliو Klebsiella .
3. يضاف 3- 4 قطرات من Methyl-Red Indicator .
4. تدون النتائج والملاحظات :

ان ظهور اللون الاحمر التوتي Cherry Red مباشرة بعد اضافة الكاشف دلاله على الفحص الموجب لاحمر المثيل. **شكل (29)**



شكل (29)اختبارقابلية بعض البكتريا لتخمر السكريات 1- الفحص الموجب2- فحص السالب .

اسم التجربة :-

اختبار تخمر البيوتانيدويل Butanediol Fermentation (Voges-Proskauer) لانواع من البكتريا المعوية.

الهدف من التجربة :-

تفريق بين بعض البكتريا المعوية وقابليتها لتخمر البيوتانيدويل.

جميع انواع *Enterobacter* و *Serratia* بالاضافه الى اجناس من *Erwinia* و *Bacillus* و *Aeromonas* لها القابلية على تخمر البيوتانيدويل .

الفحص السلبي لاحمر المثيل يمكن ان يعد دلاله على ان الكائن المجهري المنمى في وسط MR-VP broth منتج لكميات كبيره من 2,3، بيوتانيدويل (2,3، Butanediol) والايثانول بدلا عن انتاج الاحماض. انتاج هذه المنتجات النهائيه

الغير حامضيه تؤدي الى تقليل في حموضية وسط MR-VP broth (قله في انخفاض الـ pH) مؤديه الى النتيجه السلبيه بلنسبه لفحص احمر المثيل (MR). لايوجد اختبار للكشف عن (2,3، Butanediol)، مع ذلك فان(Acetoin acetylmethylcarbinol) احد المركبات الاوليه لـ (2,3، Butanediol) يمكن تحديده والكشف عنه بواسطة كاشف باريت Barritt's reagent (مكون من alpha Naphthol و KOH)، عند تلقيح وسط MR-VP broth بالبكتريا ولمدة ثلاثة ايام نقوم باضافة الكاشف ، سيتحول لون الوسط الى اللون الوردي البيرغندي (Pink-Burgundy) دلاله على الفحص الموجب لـ VP .

المواد المستخدمة :

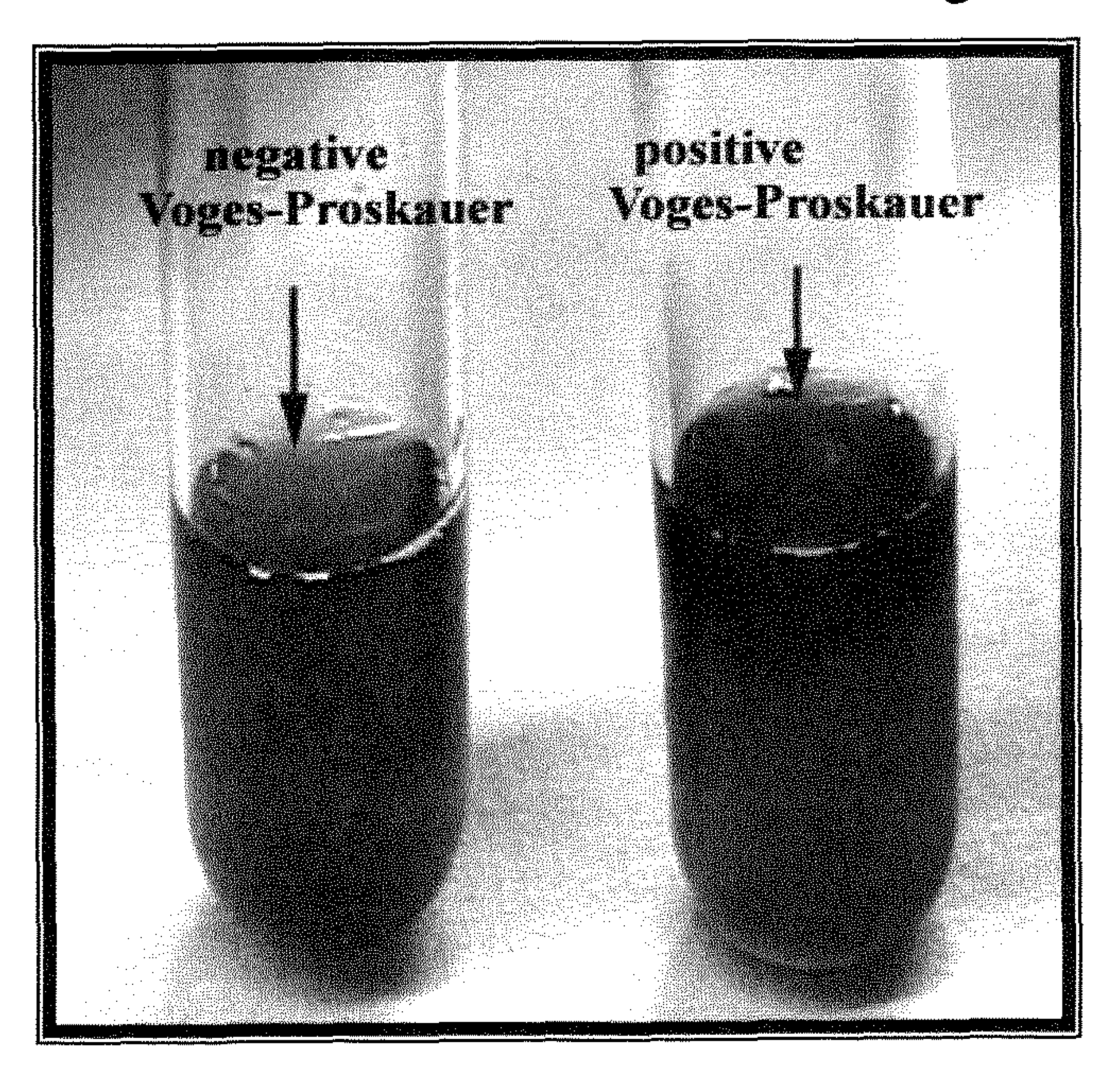
1. وسط السائل MR-VP broth .
2. انواع بكتيرية *Enterobacter* و *E. coli* و *Klebsiella*.
3. كاشف Barritt's reagent (Voges-Proskauer) Indicator .

طريقة العمل :

1. نعقم مكان العمل جيدا بالكحول اواي مادة معقمه .
2. اوساط مزروعة لانواع بكتيرية *Enterobacter* و *E. coli* و *Klebsiella* حديثة.
3. يضاف (0.5 مل) 18 قطره من محلول الكشف الاول (naphthol alpha) الى الوسط الملقح الحاوي على 1 مل من الزرع.
4. ثم يضاف كميه مساويه للكاشف الاول من الكاشف الثاني (KOH) الى نفس الانبوبه.

5. ترج الانبوبه بقوه ((يعتبر مهم جدا وذلك لغرض التهويه)) كل 20 ثانيه حتى تحول لون الوسط الى الاحمر الغامق او الوردي. شكل (30)

6. تدون النتائج والملاحظات.



شكل (30) فحص تخمر البيوتانيدويل 1 - الفحص الموجب2- فحص السالب .

اسم التجربة :-

اختبار قابلية البكتريا على استهلاك السترات Citrate Utilization

الهدف من التجربة :-

تفريق بين بعض البكتريا المعوية قابلية بعض الاحياء المجهريه مثل *Enterobacter aerogenes* و*Salmonella typhimurium* على استهلاك السترات كمصدر وحيد ورئيسي للكاربون.

وسط السترات بنوعيه (Koser's citrate medium and Simmons citrate agar) يمكن ان يستخدم في عملية الكشف عن قابلية البكتريا في استهلاك السترات. في كلا الوسطين ، مادة الـ Sodium Citrate تعتبر المصدر الرئيسي للكاربون والنيتروجين يجهز بواسطة املاح الامونيوم Ammonium salts بدلا من الاحماض الامينيه. يحوي الوسط على Bromthymol blue والذي له دور مهم في تحويل لون الوسط الى الازرق عند ارتفاع قيمة الـ pH.

المواد المستخدمة :

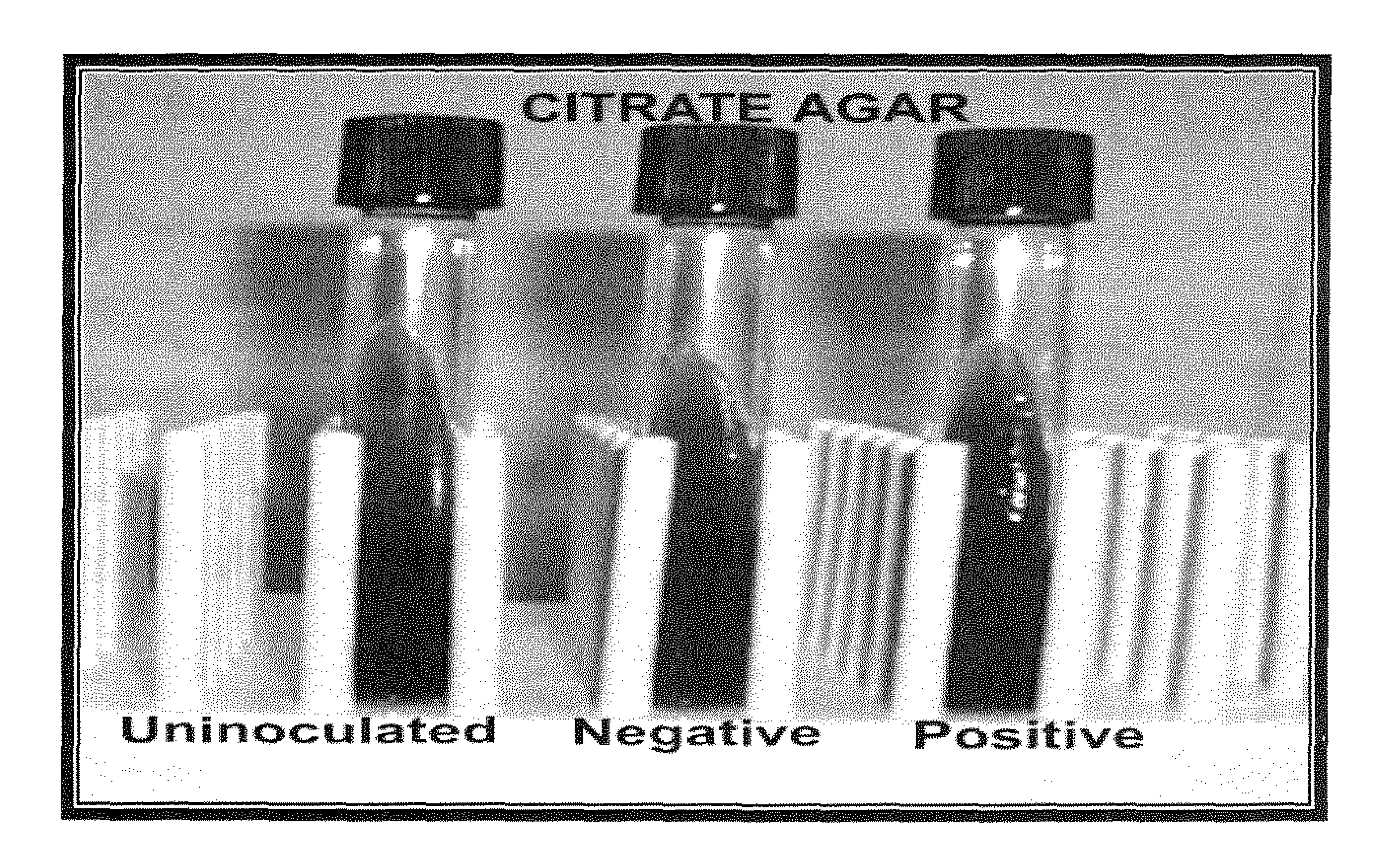
1- وسط السترات بنوعيه (Koser's citrate medium and Simmons citrate agar .

1. انواع بكتيرية *Enterobacter* و*E. coli* و*Klebsiella*.
2. كاشف Barritt's reagent (Voges-Proskauer) Indicator .

طريقة العمل :

1. نعقم مكان العمل جيدا بالكحول اواي مادة معقمه .
2. اوساط مزروعة لانواع بكتيرية Enterobacter وE. coli وKlebsiella حديثة.
3. حضن الاوساط الزرعية لمدة 24 ساعه بدرجة 37م.
4. تدون النتائج والملاحظات.

النتيجة الايجابيه للاختبار (Enterobacter aerogenes) نلاحظ لون ازرق بروسي (ازرق داكن) Prussian blue color. **شكل (31)**



شكل (31) فحص استهلاك السترات 1 - الفحص الموجب2- فحص السالب 3- سيطرة .

اسم التجربة :-

اختبار قابلية البكتريا على تحلل اليوريا Urea Hydrolysis

الهدف من التجربة :-

تفريق البكتريا المعويه عن طريق اختبار قابليتها Proteus vulgaris، Providencia، Morganella and على انتاج انزيم اليوريز Urease .

يقوم انزيم اليوريز Urease بشطر جزيئة اليوريا الى الامونيا، وسط اليوريا يعتبر من الوساط التفريقية Buffered solution المنتجه من خلاصات الخمائر بالاضافه الى اليوريا . كما يحوي على الـ Phenol red كمحدد للـ pH.

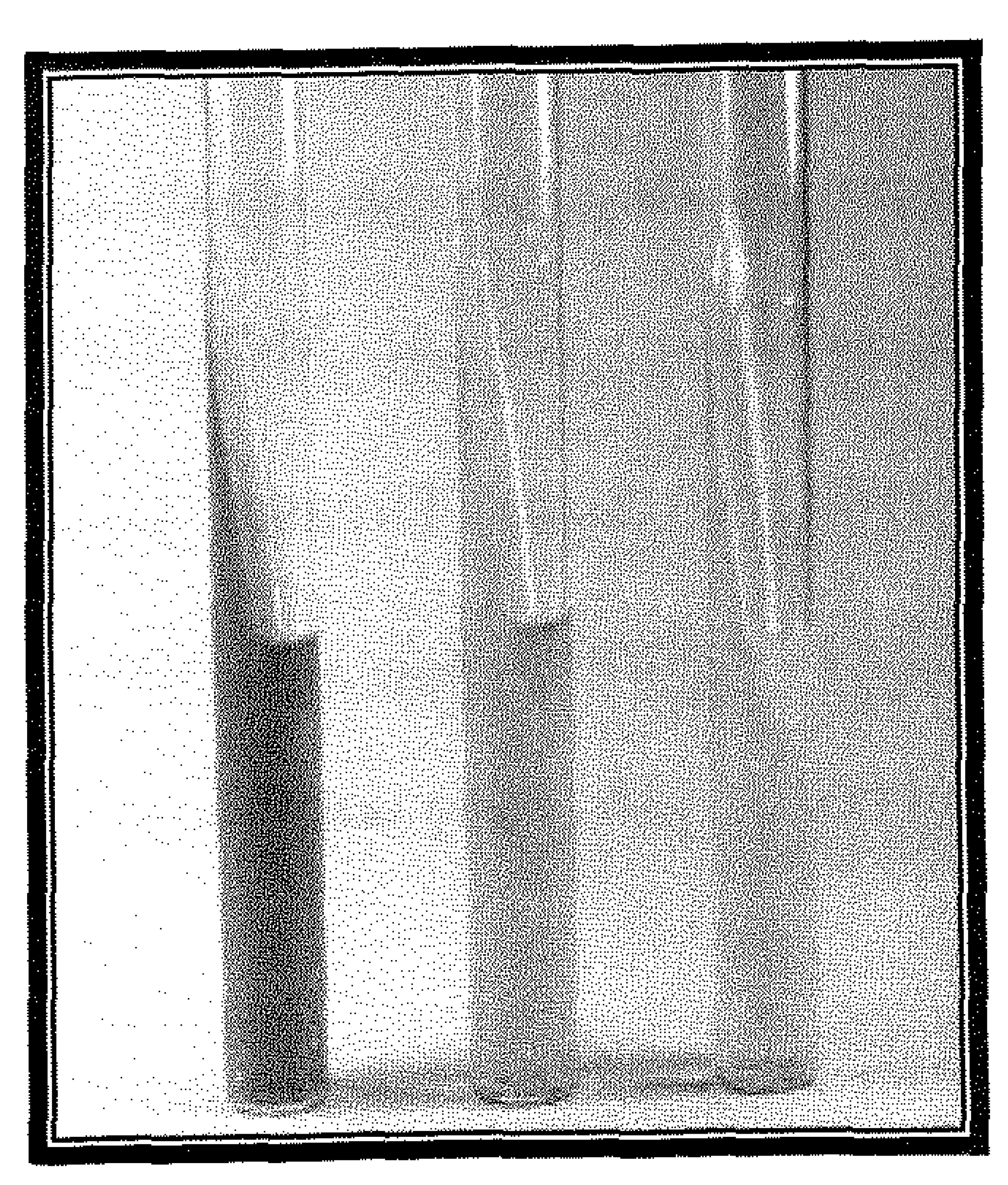
المواد المستخدمة

1. وسط اليوريا.
2. انابيب اختبار.
3. اليوريا.

طريقة العمل :

1. نعقم مكان العمل جيدا بالكحول اواي مادة معقمه .
2. تعقم اليوريا بواسطة الترشيح ثم تضاف الى الوسط المعقم.
3. نزرع كل من البكتريا Providencia، Morganella and و Proteus vulgaris على وسط اليوريا .
4. حضن الاوساط الزرعية لمدة 24 ساعه بدرجة 37م.
5. تدون النتائج والملاحظات

عند افراز اليوريز في الوسط الملقح من قبل البكتريا فان الامونيا المنشطره من اليوريا بواسطة الانزيم سوف ترفع قيمة الـ pH. وبسبب القيمه العاليه للـ pH فان Phenol red يتغير من الاصفر الى الاحمر الكرزي Cerise Red color. شكل(32)



شكل (32) فحص تحلل اليوريا .

اسم التجربة :-

اختبار قابلية البكتريا على تكوين السكر الثلاثي الحديدي(Triple Sugar Iron (TSI) فحص كلكلر الحديدي Iron agar (KIA Kligler's

الهدف من التجربة :-

للكشف عن التخمر الكاربوهيدراتي وانتاج الـ H2S في البكتريا المعويه.

تعد الاوساط (TSI) و (KIA) من الاوساط التي تمتلك العديد من المواد الاوليه التي تستطيع البكتريا المعويه استهلاكها متضمنة عدة انواع من الكاربوهيدرات والبروتينات اضافة الى الثايوسلفات. اعتمادا على نوع المواد المستخدمه في عملية التخمر يمكن تفريق البكتريا المعويه.

مكونات وسط (TSI):

1. خلاصة لحم البقرBeef Extract.
2. خلاصة الخمائر Yeast Extract.
3. السكريات (الكلوكوز Glucose ، اللاكتوز Lactose و السكروز Sucrose).

مكونات وسط (KIA):

1. خلاصة لحم البقرBeef Extract.
2. خلاصة الخمائرو Yeast Extract.

2- السكريات(الكلوكوز Glucose و اللاكتوز Lactose).

المواد المستخدمة

1. وسط TSI او وسط KIA.
2. انواع بكتيرية *Enterobacter*و *E. coli* و*Klebsiella*.

3. انابيب اختبار.

طريقة العمل :

1. نعقم مكان العمل جيدا بالكحول اواي مادة معقمه .
2. تلقح الاوساط الزرعية بالبكتريا المعوية بواسطة الطعن الى اسفل الانبوبه.
3. ثم التخطيط على السطح الوسط الزرعي .
4. حضن الاوساط الزرعية لمدة 24 ساعه بدرجة 37م.
5. تدون النتائج والملاحظات.

يعتبر Sodium Thiosulfate المصدر الوحيد للسلفات لغرض انتاج H2S. كلا الوسطين يحويان على Ferrous Sulfate والتي تتفاعل مع H2S لتكون الترسب الاسود في قعر الانبوبه . الكاشف الموجدود في الوسط لـ pH هو Phenol Red. يعطي Phenol Red لون احمر عند pH 7.4 و لون اصفر في الوسط الحامضي ولون احمر قاتم في الوسط القاعدي

فحص حليب اللتموس Litmus Milk Reactions

يحوي حليب اللتموس على 10٪ من Skim Milk وكميات قليله من اللتموس (تعتبر كدليل على تغير الـ pH) عند تحضير الوسط يكون الـ pH 6.8 . تعتبر هذه الدرجه من الحموضه ممتازه وملائمه جدا لنمو العديد من الاحياء المجهريه ويمكن ان يعتبر مساعدا جدا في عملية التشخيص. بالاضافه الى الى ذلك : لمعرفة وجود او عدم وجود تخمر في الوسط يمكن من خلاله معرفة نشاط بعض الخصائص الانزيميه البروتينيه للبكتريا. العديد من البكتريا الاختياريه التي تملك خاصيه الاختزال القوي (Powers Reducing Strong) تتمكن من

استهلاك اللتموس كبديل لاستقبال الالكترونات مؤديه لتغير لون الوسط. يحتاج التفاعل الى 4- 5 ايام وبدرجه 37م لكي يكتمل مع مراقبته كل 24 ساعه.

التفاعلات:

1) التفاعل الحامضي Acid Reaction : يصبح اللتموس وردي اللون وهو مثالي للتخمر البكتيري.

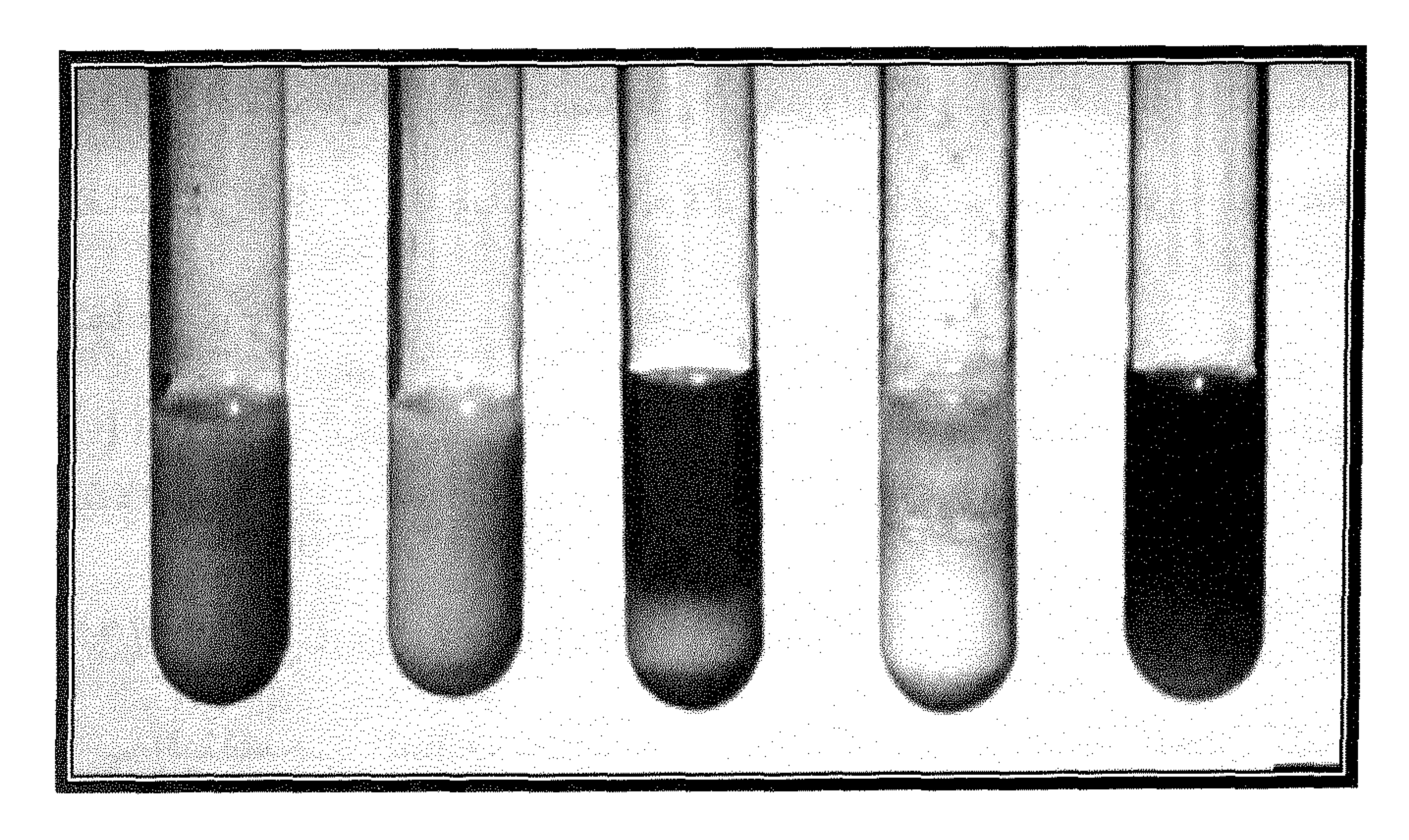
2) التفاعل القاعدي Reaction Alkaline : يتحول اللتموس الى الازرق او البنفسجي الفاتح.العديد من البكتريا ذات النشاط المحلل للبروتينات تسبب هذه الظاهره خلال الـ 24 ساعه الاولى.

3) تفاعل اللتموس Litmus Reduction : الوسط الزرعي يتحول الى اللون الابيض بسبب استهلاك الاوكسجين اثناء تكاثر البكتريا.

4) تكوين الخثاره Coagulation Curd formation : تصلب الوسط نتيجة تخثر البروتين ، امل انبوبة الاختبار بزاويه 45^{o} لتشاهد فيما اذا كان هناك تخثر او لا.

5) البيتنه Peptonization : يصبح الوسط نصف شفاف وغالبا ما يعطي لون رمادي على السطح بسبب البكتريا ذات النشاط المحلل للبروتينات.

6) اللزوجه Ropiness : تكوين نمو كثيف لزج في قعر الانبوبه. **شكل (33)**



شكل (33) تفاعلات حليب اللتموس.

الاختبارات الكيموحيوية المستخدمة في تعريف البكتيريا (الإنزيمات البكتيرية) Biochemical activity tests for bacterial identification (Enzymes)

تقوم الكائنات الدقيقة (كالبكتيريا) بافراز انواع عديدة من الانزيمات لتحليل الكثير من المواد المعقدة الكربوهيدراتية والبروتينية والدهنية لتحوله الى جزيئات صغيرة الحجم يمكن امتصاصها.

اسم التجربة:

اختبار قدرة البكتيريا على تحليل النشا(Starch hydrolysis)

الهدف من التجربة: التمييز بين الكائنات الدقيقة عن طريق قدرتها على تحليل النشا.

النشا هو مادة كربوهيدراتية يتكون من نوعين من الوحدات: **اميلوز** Amylose (سلاسل مستقيمة من الجلوكوز) **واميلوبكتين** Amylopectin (سلاسل متفرعة من الكلوكوز)

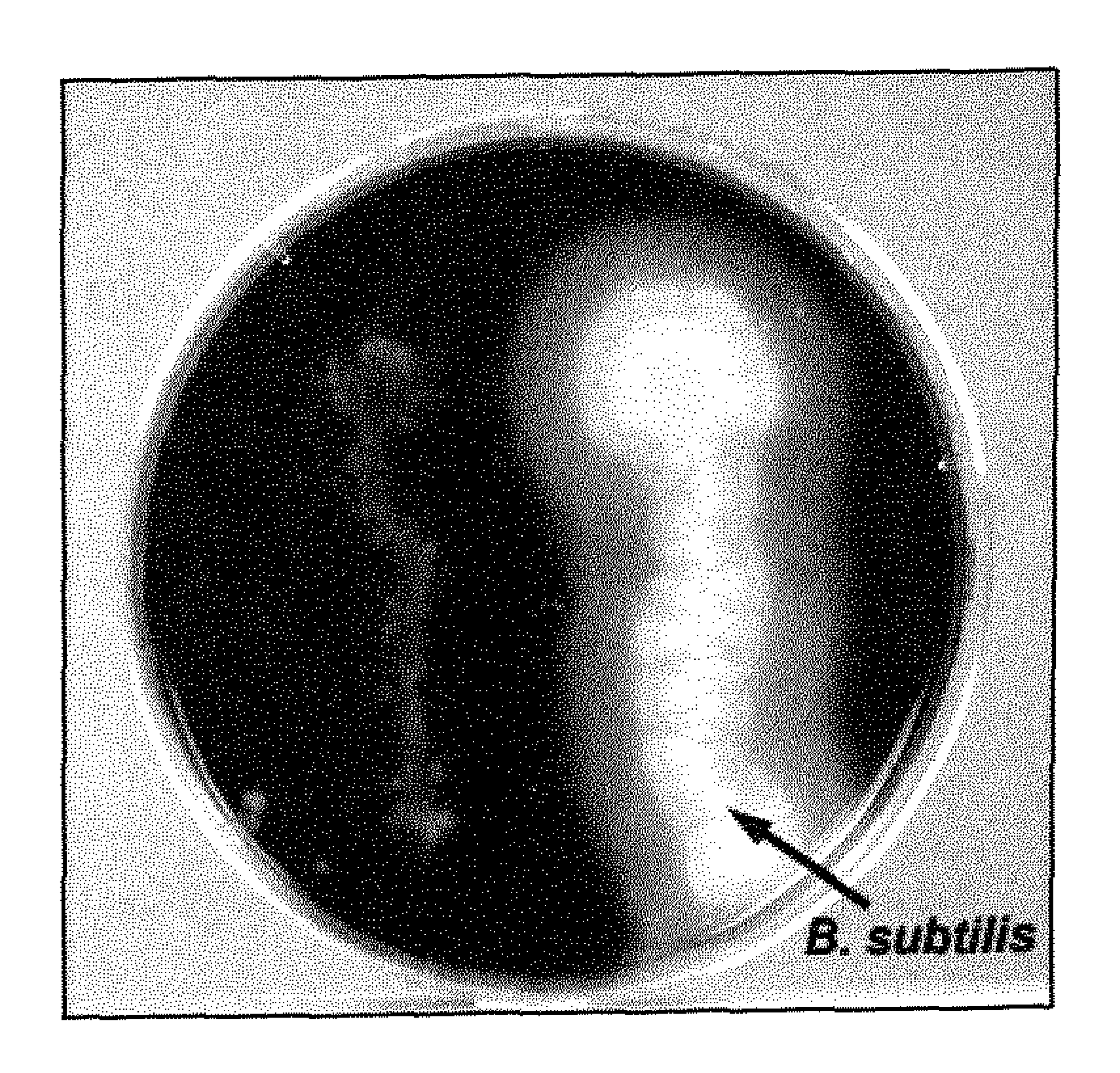
انواع الانزيمات اللازمة لتحليل النشا المفرزة من قبل الكائن الحي المجهري :

1) ά-B amylase (يكسر سلاسل الاميلوز المستقيمة إلى وحدات الكلوكوز)

2) amilo 1-6 glucosidase (يكسر سلاسل الاميلوبكتين المتفرعة الى وحدات الكلوكوز)

طريقة العمل:

1. نعقم مكان العمل جيدا بالكحول اواي مادة معقمه .
   a. نحضر طبقين من وسط اكار النشا .
2. نلقح الوسط الزرعي بمزرعة بكتيرية حديثة العمر بواسطة ابرة تلقيح ويترك الطبق الاخر للمقارنة.
   a. يحضن الطبق مقلوب عند 37م لمدة 24- 48ساعة.
3. يكشف عن قدرة البكتيريا على تحلل النشا باسخدام اليود، حيث يغمر سطح الوسط بكمية مناسبة من اليود. وجود هالة شفافة حول النمو البكتيري يدل على ان البكتيريا قادرة على تحلل المشا (نشا +يود لون أزرق) أي انها تفرز انزيم الأميليز للوسط الخارجي الذي يكسر النشا الى سكريات بسيطة (الكلوكوز) وبالتالي تظهر المنطقة الشفافة الخالية من النشا . **شكل (34)**
4. اذا لم يوجد منطقة عديمة اللون حول النمو يعني ان عدم قدرة البكتيريا على تحليل النشا.
5. تدون النتائج والملاحظات.



شكل (34) يبين نمو بكتريا B.subitilis على وسط اكار النشا .

اسم التجربة:

دراسة قدرة البكتيريا على تحلل الجيلاتين(Gelatin Liquefaction)

الهدف من التجربة:

التعرف على البكتيريا القادرة على اسالة الجيلاتين.

الجيلاتين: مادة بروتينية محضر من التحلل المائي للكولاجين وهناك بعض الأنواع البكتيريه القادرة على انتاج انزيم خارجي Gelatinase الذي يحلل الجيلاتين

طريقة العمل:

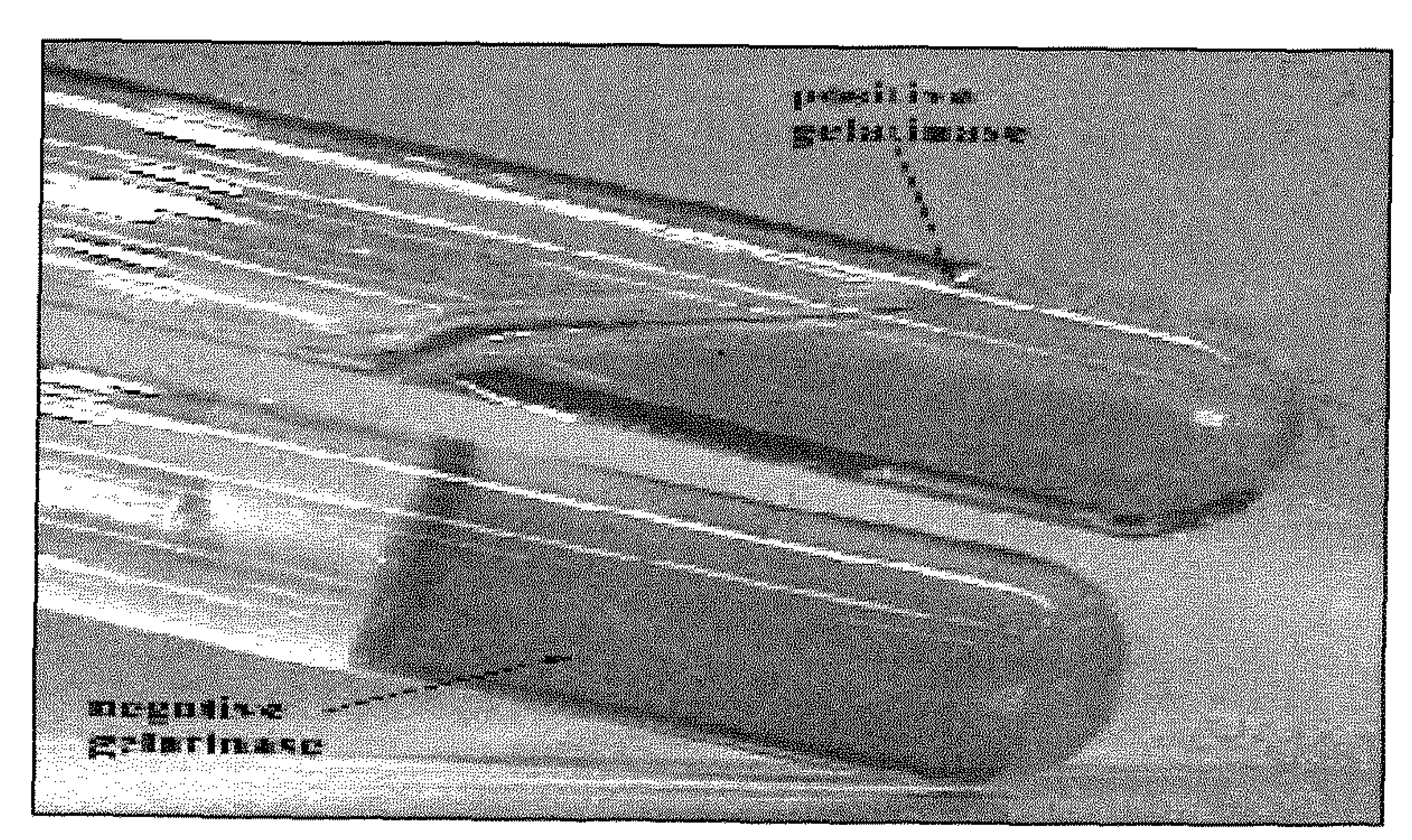
1. نعقم مكان العمل جيدا بالكحول اواي مادة معقمه .
2. ناخذ انبوبتين تحتوي على كمية مناسبة من وسط الجيلاتين المغذي nutrient gelatin

3. تلقح الانبوبة بمزرعة بكتيرية حديثة العمر بطريقة الوخز(الانبوبة الثانية سيطرة)

4. تحضن الانبوبة عند 30- 37م لمدة من 48- 72ساعة.

5. تدون النتائج والملاحظات.

❖يكشف عن قدرة البكتيريا على تحلل الجيلاتين بوضع الانابيب في وعاء يحتوي على ثلج ويترك لمدة 15 دقيقة، ثم تمسك الانبوبة ويتم امالتها، اذا وجدت ان الوسط مازا ل متماسكا يعني ان الجيلاتين لم يتحلل بواسطة البكتيريا أما اذا لاحظت اسالة الجيلاتين فهذا يدل على ان البكتيريا افرزت انزيم Gelatinase الذي يحلل الجيلاتين. **شكل (35)**



شكل (35) يبين قدرة البكتيريا على تحلل الجيلاتين في الانابيب.

اسم التجربة:

اختبار قدرة البكتيريا على تحليل الكازين .

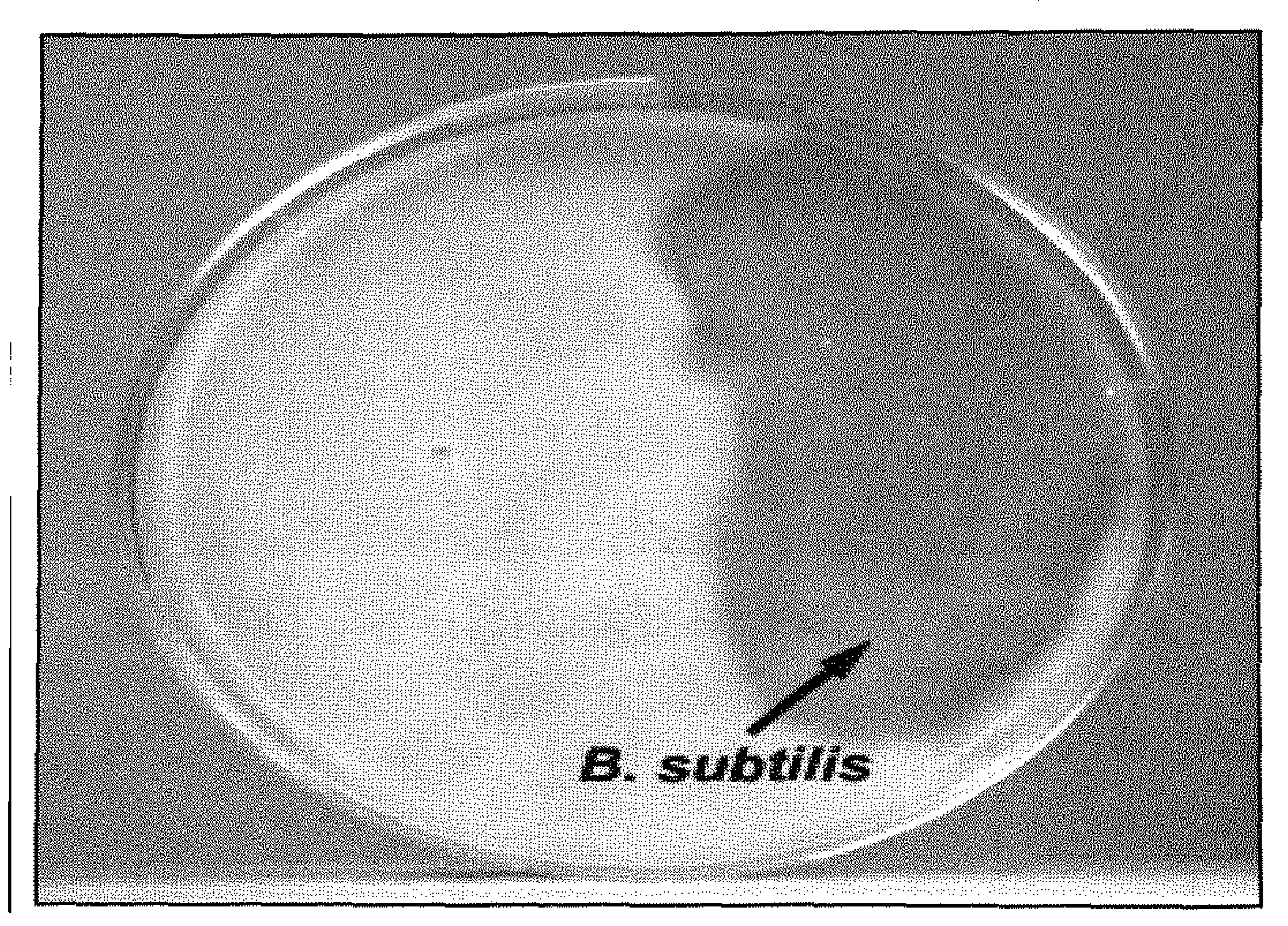
الهدف من التجربة:

تمييز الانواع البكتيرية المحللة للكازين

الكثير من البكتيريا تفرز الانزيم الخارجي Caseinas الذي يحلل الكازين الى مواد ذائبة شفافة

طريقة العمل:

1. نعقم مكان العمل جيدا بالكحول اواي مادة معقمه .
2. نصب وسط اكار اللبن في طبقين.
3. يلقح الطبق ببكتيريا حديثة العمر بابرة التلقيح (الطبق الاخر سيطرة)
4. يحضن الطبق مقلوب عند 37م لمدة 24- 48 ساعة.
5. تسجل النتيجة بعد التحضين مباشرة، ان النتيجة الموجبة تعني وجود هالة شفافة حول النمو البكتيري يدل على ان البكتيريا حللت الكازين بافراز انزيم الكازينيز، اما النتيجة السالبة تعني لا توجد منطقة رائقة حول النمو دليل على عدم قدرة البكتيريا على تحلل الكازين. شكل (36)



شكل (36) نمو البكتيريا B.subitilis على وسط اكار اللبن و تحللها االكازين.

اسم التجربة:

اختبار قدرة البكتيريا على تحلل الدهون Lipid hydrolysis

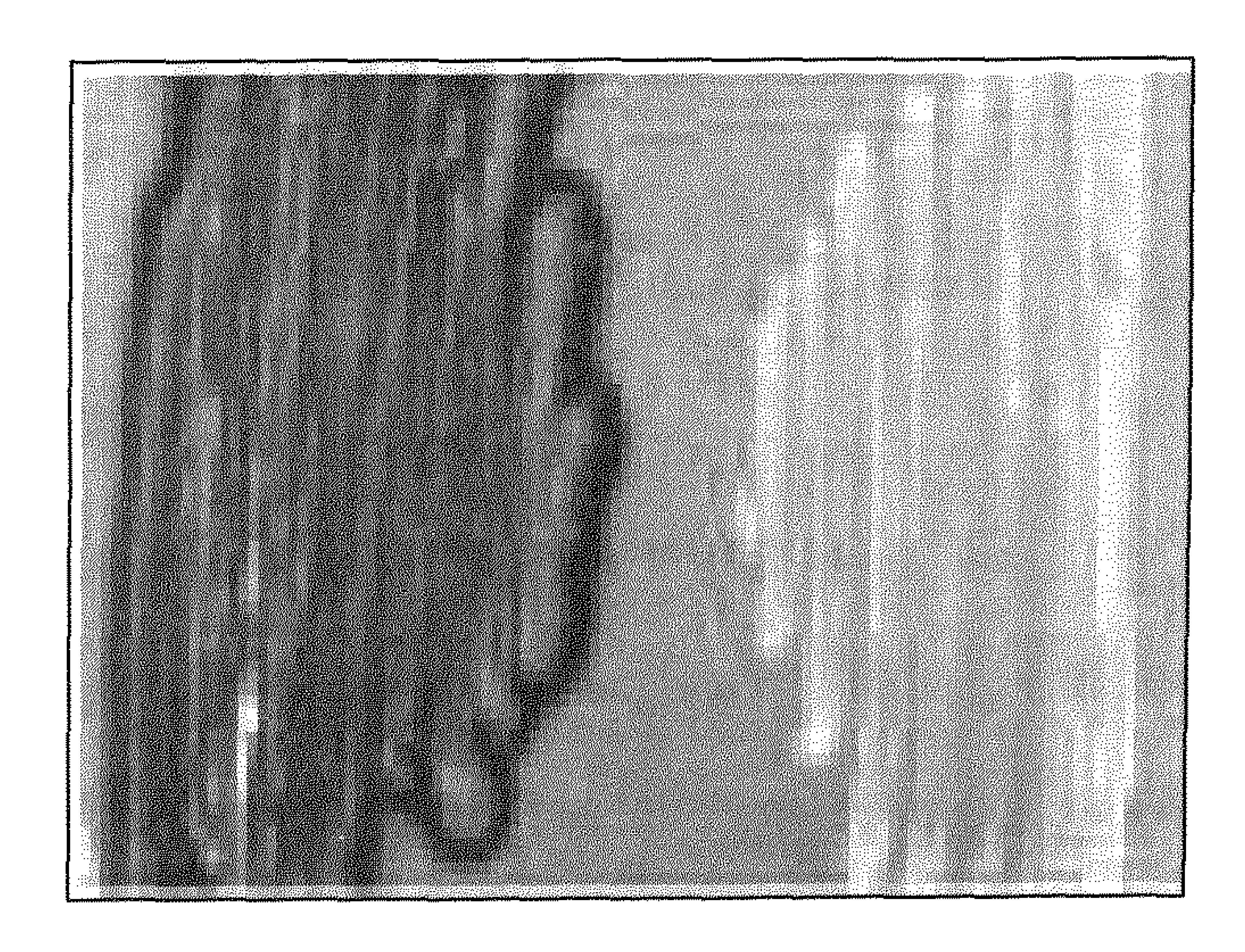
الهدف من التجربة:

التعرف على قدرة الانواع البكتيرية على تحليل الدهن.

بعض البكتيريا لها القدرة على تحليل الدهون نتيجة الى افراز انزيم Lipase الذي يقسم جزيء الدهن الى جزيء كليسرول و3 جزيئات من 3 احماض دهنية.

طريقة العمل:

1. **نعقم مكان العمل جيدا بالكحول اواي مادة معقمه .**
2. **نصب وسط اكار الدهن بطبقين .**
3. **نلقح الوسط الزرعي بمزرعة حديثة العمر بابرة التلقيح والطبق الثاني سيطرة.**
4. **يحضن الطبق عند 37م لمدة 96 ساعة.**
5. **يكشف عن قدرة البكتيريا هلى تحلل الدهن باضافة كمية من محلول كبريتات النحاس 20- 10٪ لمدة 10 دقائق، ثم تخلصي من المحلول.**
6. **ظهور لون أزرق مخضر على النمو دليل على قدرة البكتيريا على تحليل الزيت بافرازها للانزيم المحلل. شكل (37)**



شكل (37) قدرة البكتيريا على تحليل الزيت على وسط اكار الدهن .

اسم التجربة:

اختبار قدرة البكتيريا على انتاج كبريتوز الايدروجين H_2S Production

الهدف من التجربة:

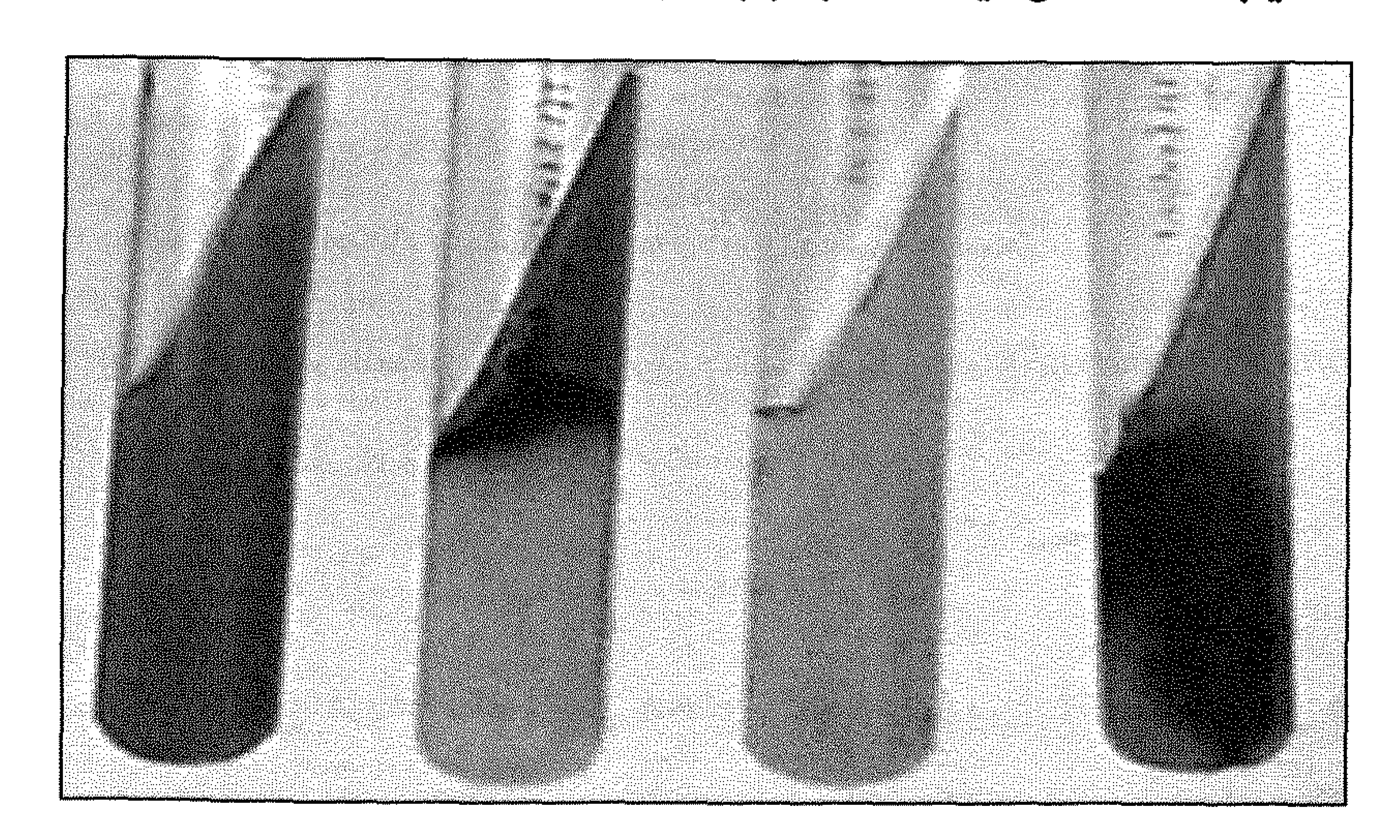
توضيح نشاط بعض البكتيريا في تحليل cyctine وانتاج H_2S.

الاحماض الامينية هي ناتج تحلل البروتينات يمكن لبعض البكتيريا ان تحلل بعض هذه الاحماض الامينية الى مواد ابسط تركيبا.

بعض البكتيريا تنتج غاز كبريتوز الايدروجين عند تحللها للحمض الاميني Cysteine (حمض اميني يحتوي على الكبريت) بواسطة افرازها لانزيم Cysteine desulforaseتستعمل وسط كليكلر للكشف عن انتاج H_2S حيث تحتوي على كبريتات الحديدوز الذي يتفاعل مع H_2S مكونا راسب اسود من كبريتيد الحديدوز

طريقة العمل:

1. نعقم مكان العمل جيدا بالكحول اواي مادة معقمه .
2. نصب انبوبتين اختبار بوسط كليكلر Kligler.
3. تلقح الانبوبة بطريقة الوخز بمزرعة بكتيرية حديثة (Proteus vulgaris) ويحتفظ بالانبوبة الثانية بدون تلقيح سيطرة.
4. تحضن الانبوبة عند 30- 37م لمدة من 2- 7 ايام
5. تسجل النتيجة الموجبة على اساس وجود راسب اسود على طول خط الوخز في حالة تكون غاز H2S ، كما يلاحظ تغير لون الوسط الاحمر الى الاصفر نتيجة انخفاض قيمة PH بسبب تكون الاحماض. شكل (38)



شكل (38) قدرة البكتيلريا على تكوين راسب اسود على طول خط الطعن وتكون غاز H_2S

اسم التجربة:

اختبار قدرة الانواع البكتيرية لانتاج انزيم الاوكسيديز.

الهدف من التجربة:

تشخيص الاجناس المختلفة من البكتيريا السالبة لكرام.

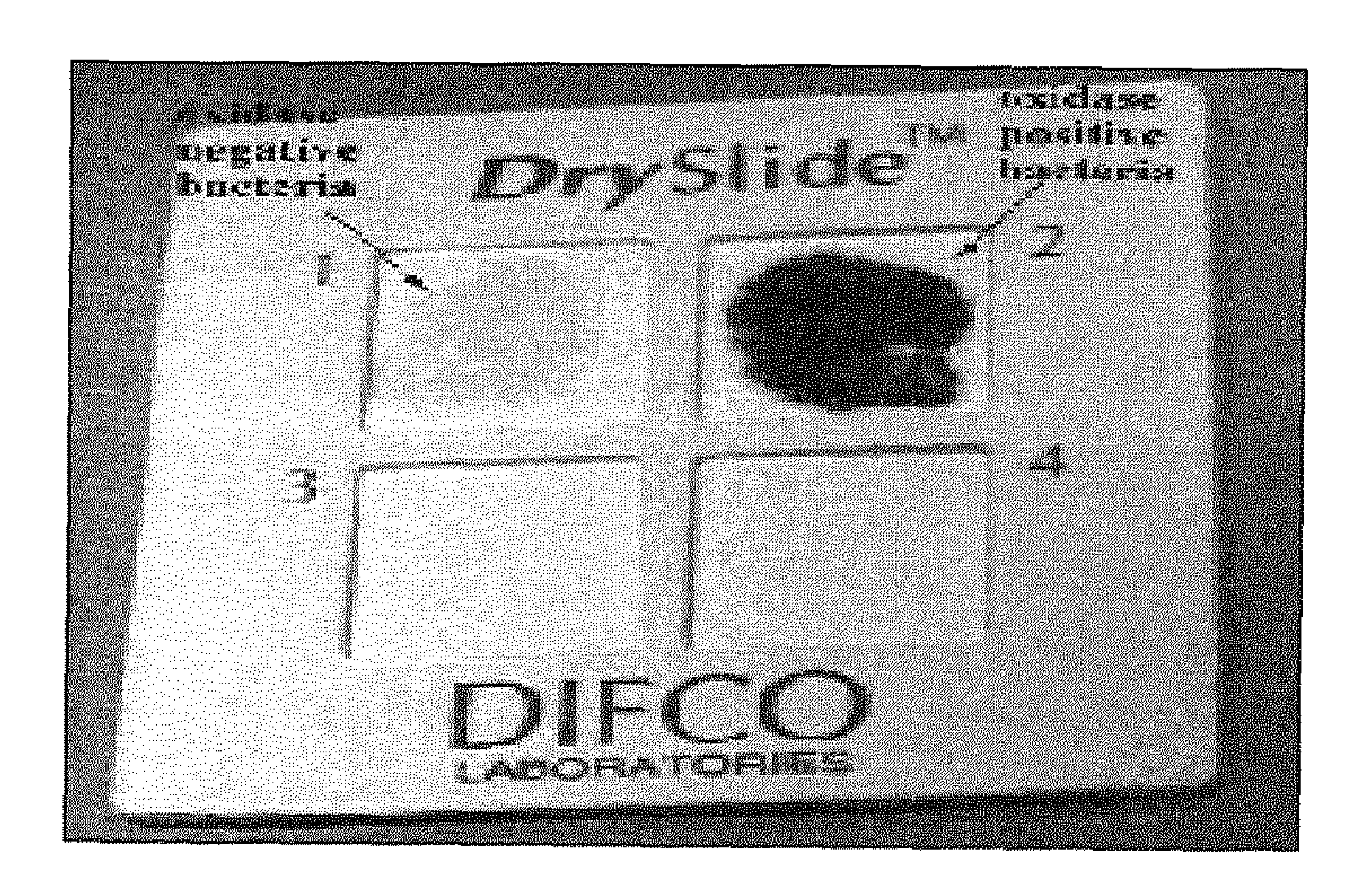
الاوكسيديز انزيمات مؤكسدة ضمن سلسلة الانزيمات التنفسية المسؤلة عن تفاعلات الفسفرة التاكسدية البكتيريا التابعة لعائلة *Enterobacteriaceae* **(سالبة) ومعظم انواع الجنس** *Pseudomonas* **(موجبة).**

الاكسدة البيولوجية Biooxidations

هي تلك التفاعلات الانزيمية المختصة بعمليات التنفس والتخمر.

طريقة العمل:

1. **نعقم مكان العمل جيدا بالكحول اواي مادة معقمه .**
2. **يلقح وسط الاكار الكلوكوز بالبكتيريا** *Pseudomonas aeroginosa* **بطريقة التخطيط.**
3. **تحضن عند 30- 37م لمدة 24 ساعة.**
4. **يغمر سطح المزرعة بقليل من محلول الاكسيديز (1٪ داي ميثيل فينيلين داي امـــين هيدروكلورايــد** (Dimethyl phenylenediamine hydrochloride.
5. **تسجل النتيجة ، تظهر المستعمرات الموجبة وردية اللون ثم تتدرج لتصبح بنية ثم حمراء داكنة ثم سوداء شكل (39)**



شكل (39) ظهور المستعمرات البكتيرية داكنة في اختبار الاوكسديز.

اسم التجربة:

اختبار الكاتاليز Catalase production test

الهدف:

التعرف على البكتيريا المنتجة للكاتاليز(عادة يستخدم للتفرقة بين المكورات العنقودية والسبحية).

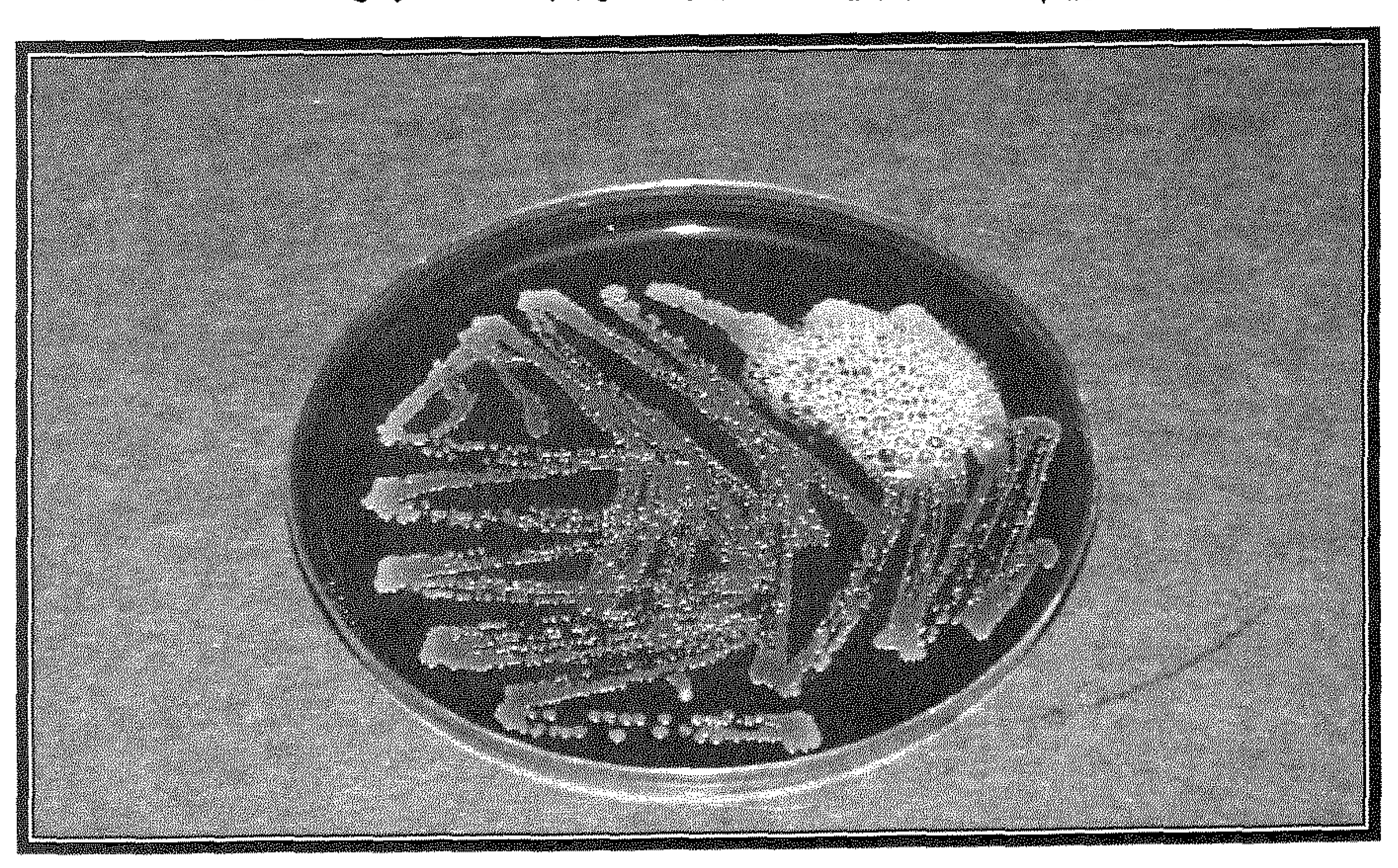
معظم البكتيريا الهوائية اجبارا واختيارية التهوية (تستعمل O2) تنتج H_2O_2 (فوق اكسيد الهيدروجين) واستمرار نموها في وجود هذا الناتج السام يعود لاكتلاكها انزيم الكاتاليز الذي يحلل H_2O_2

$$H_2O_2 \xrightarrow{catalase} 2H_2O + O2$$

طريقة العمل:

1. نعقم مكان العمل جيدا بالكحول اواي مادة معقمه.
2. مزارع بكتيرية مزرعة حديثة العمر واخرى قديمة.

3. يغمر سطح المزرعة بكمية من محلول 3٪فوق اكسيد الهيدروجين.
4. تسجل النتيجة ان تصاعد فقاعات من المزرعة الحديثة نتيجة انطلاق غاز O2 بفعل انزيم الكاتاليز يعثل نتيجة موجبة للاختبار. **شكل (40)**



شكل (40)البكتيريا المكورات العنقودية المنتجة للكاتاليز.

اسم التجربة:

اختبار احمر المثيل Methyl Red (MR) Test

الهدف:

التمييز بين قابلية البكتيريا على تخمر الكلوكوز وانتاج كمية الاحماض.

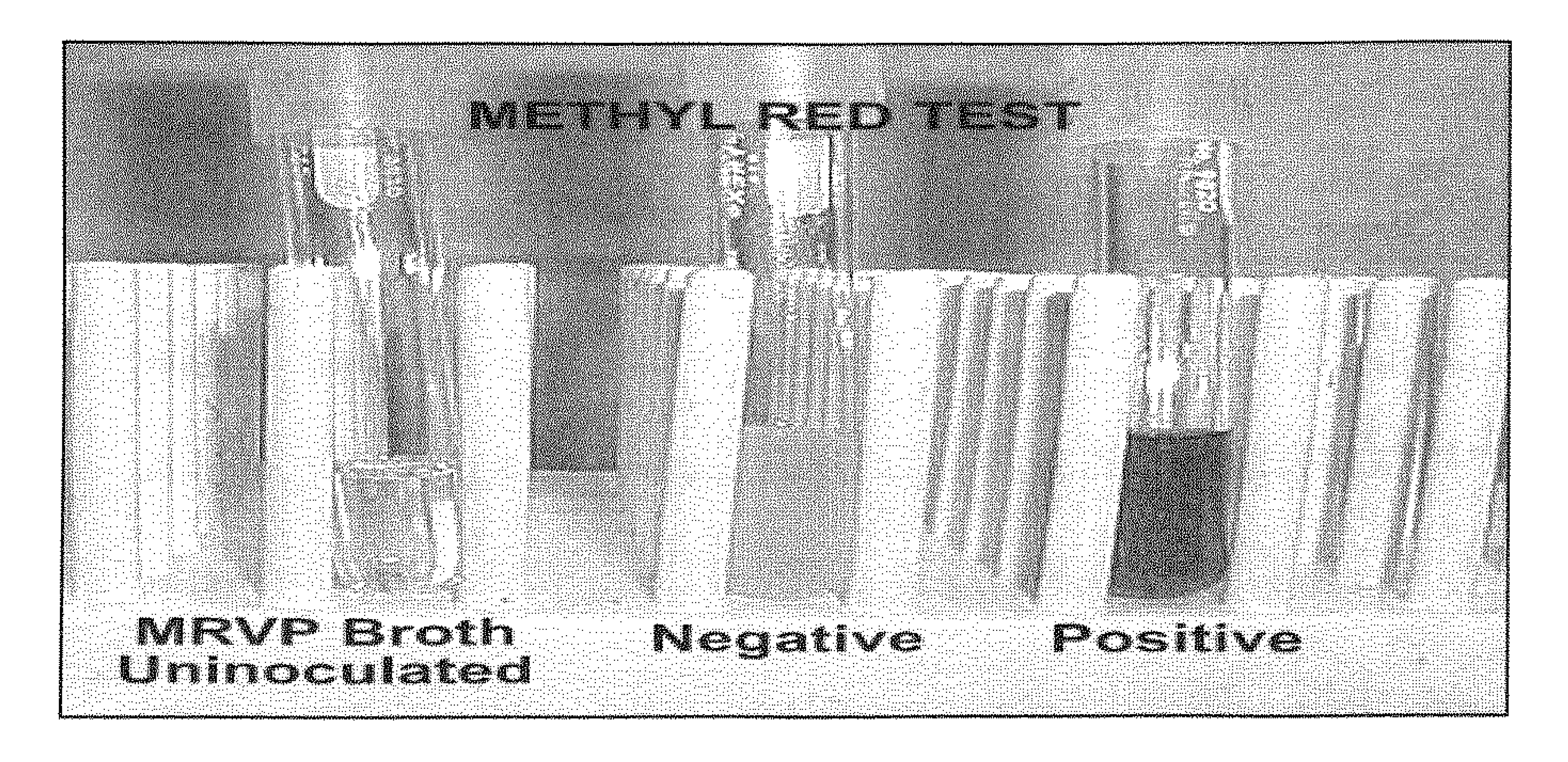
لتخمر الحمضي المختلط Mixed acid fermentation

بعض البكتيريا السالبة لصبغة لكرام التي تعيش بامعاء الانسان لها القدرة على تخمر الكلوكوز مكونة كميات كبيرة من احماض اللاكتيك والخليك

والسكسينيك والفورميك علاوة على Co2 والكحول والهيدروجين وجود هذه الاحماض باالوسط الزرعي سيخفض قيمة PH ، فاذا اضيف للمزرعة دليل احمر الميثيل سيظهر لون احمر ممايدل على ان البكتريا مخمرة Mixed acid fermenter .

طريقة العمل:

1. نعقم مكان العمل جيدا بالكحول اواي مادة معقمه.
2. تلقح انبوبة محتوية على وسط فوجس بروسكاور- احمر الميثيل MR-VPmedium بمزرعة حديثة، والانبوبة الاخرى سيطرة.
3. يتم التحضين عند 37م لمدة 48 ساعة.
4. نختبر قدرة البكتيريا على انتاج الحامض باضافة عدة نقاط من دليل احمر الميثيل للمزرعة 5- تسجل النتيجة. ان ظهور اللون الاحمر بالوسط الحمضي واصفر بالوسط القاعدي ، اذا احتفظ الدليل بلونه الأحمر يعني ان الاختبار موجب. شكل (41)



شكل (41) اختبار احمر الميثيل 1- الفحص الموجب 2- فحص السالب3- سيطرة.

اسم التجربة:

اختبار فوكس برسكاور Voges Proskaur (VP) Test.

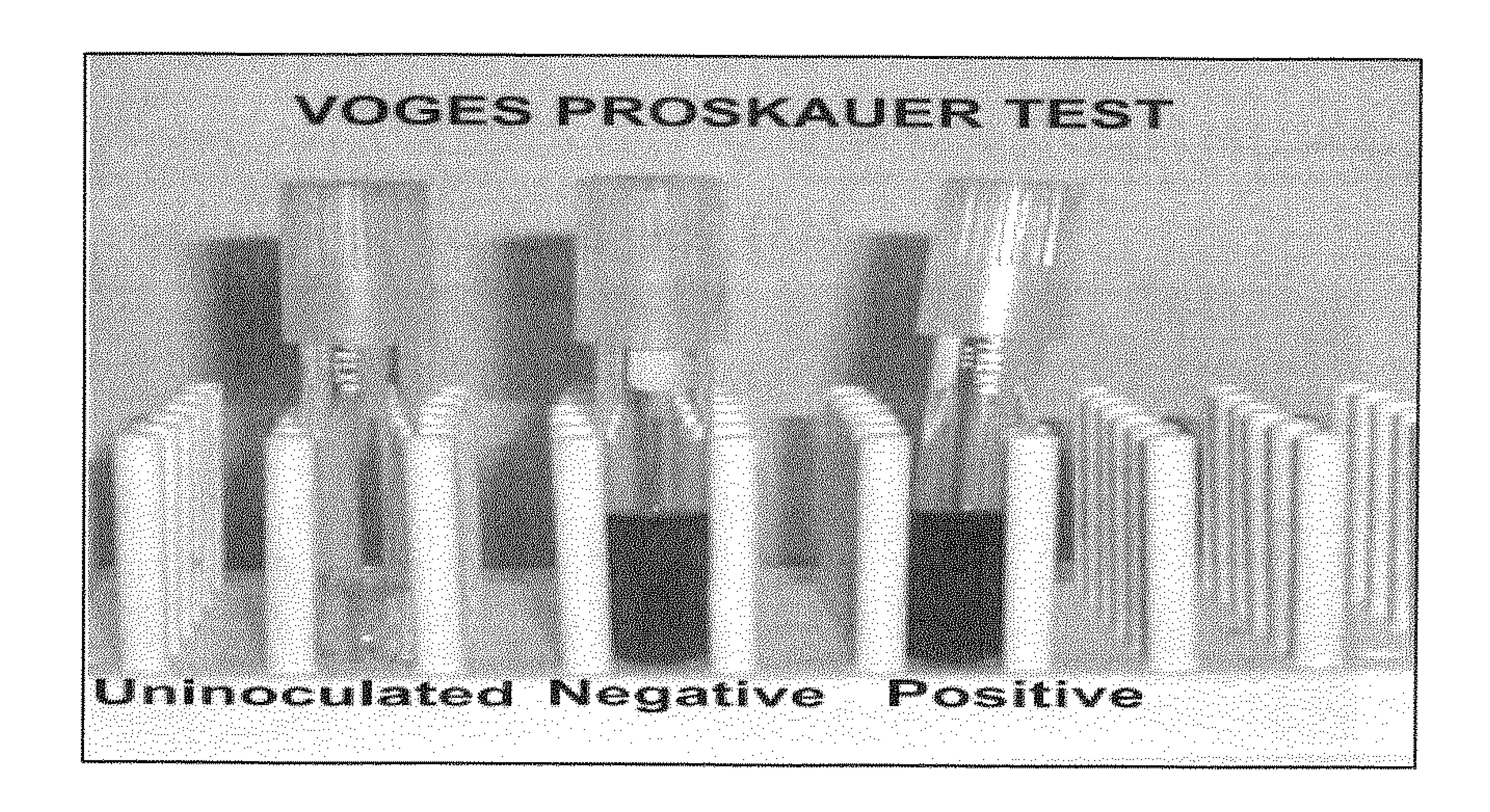
الهدف:

الكشف عن المركب المتعادل التاثير Acetyl Methyl Carbinol (a.m.c) اثناء عملية تخمر الكلوكوز.

عند نمو البكتيريا في الوسط تنتج للوسط الخارجي كمية من الاحماض وتراكمها يثبط البكتيريا نتيجة انخفاض قيمة PH، الاان هناك بعض انواع البكتيريا تنتج مواد قاعدية وسطية تعادل فعل تلك الاحماض وبالتالي تنمو ويمكن التحقق من وجود (a.m.c) بواسطة كاشف باريت Barritt's reagent.

طريقة العمل:

1. نعقم مكان العمل جيدا بالكحول اواي مادة معقمه.
2. كل مجموعة تلقح انبوبة بها وسط MR-VP medium بمزرعة بكتيرية حديثة.
3. تحضن الانابيب عند 37م لمدة 48 ساعة.
4. يكشف عن قدرة البكتيريا على انتاج (a.m.c) باضافة بضع قطرات من كاشف **باريت أ** (يتكون من الفانفثول) ثم مقدار من كاشف **باريت ب** (عبارة عن محلول هيدروكسيد البوتاسيوم) ، تترك الانابيب لمدة 5- 15 دقيقة.
5. تسجل النتيجة تكون حلقة حمراء عند سطح الوسط دليل على ان الاختبار موجب. **شكل (42)**



شكل (42) اختبار فوكس برسكاور 1- الفحص الموجب 2- فحص السالب3- سيطرة .

اسم التجربة:

اختبار قدرة البكتيريا على انتاج انزيم الكواكيوليز

الهدف من التجربة:

التمييز بين المكورات العنقودية الممرضة Pathogenic والغير ممرضة Non pathogenic

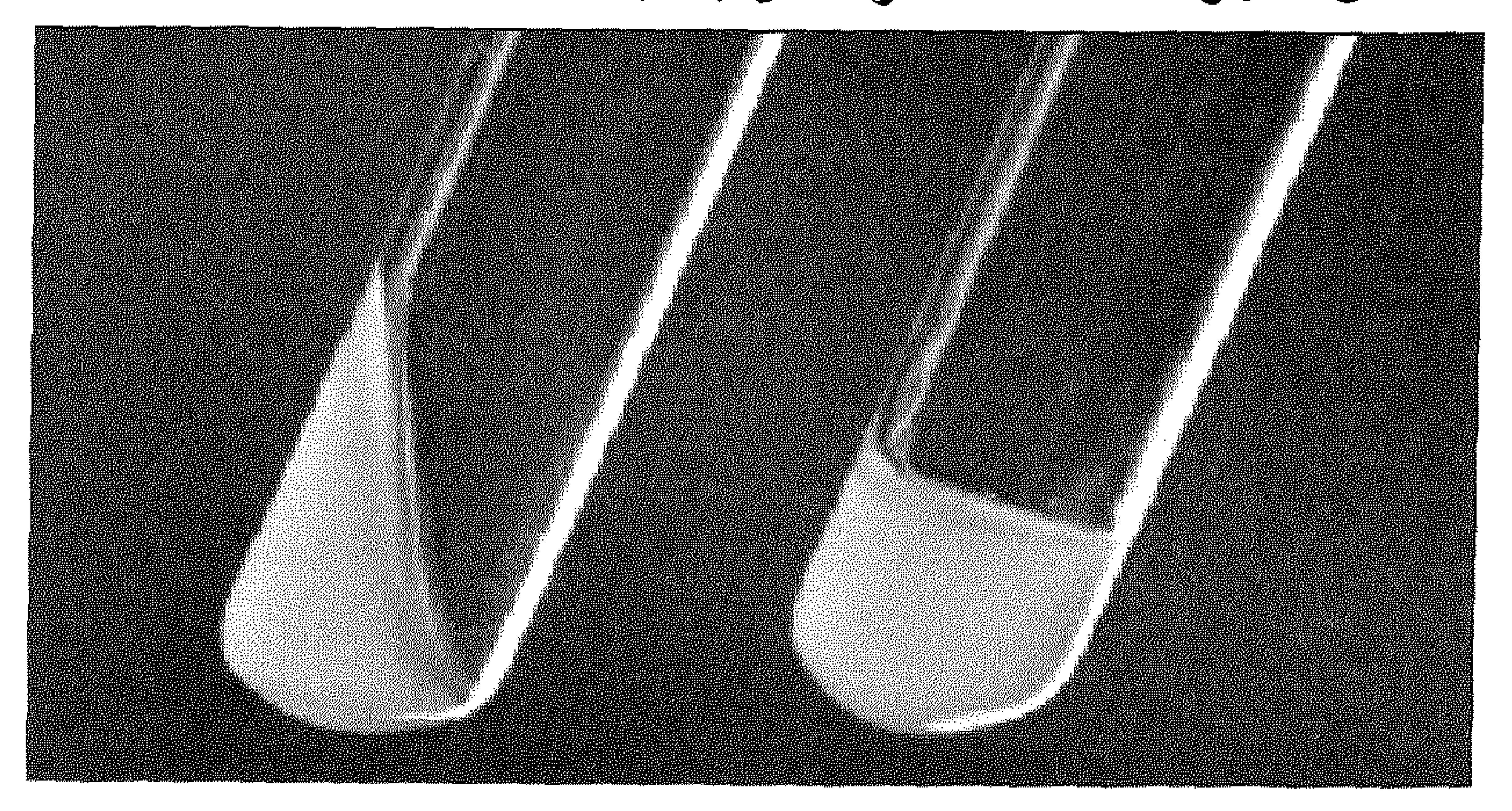
انزيم الكواكيوليزCoagulase Enzyme

ان عمل هذا الانزيم هو تخثر Coagulation بلازما الدم حيث يحول مادة الفيبرينوجين Fibrinogen الموجودة في البلازما الى فيبرين Fibrin.

طريقة العمل:

1. ينقل 0.5 مل من البلازما الى انبوبة اختبار معقمة.
2. يضاف كمية من المزرعة البكتيري الحديثة.

3. تحضن عند 37م لمدة24 ساعة مع مراعة فحص الانبوبة كل نصف ساعة حتى تظهر علامات التخثر. **شكل (43)**



شكل (43) اختبار قدرة البكتيريا على انتاج انزيم الكواكيوليز 1- الفحص الموجب 2- فحص السالب.

اسم التجربة:

اختبار قدرة البكتيريا على افراز انزيم DNase

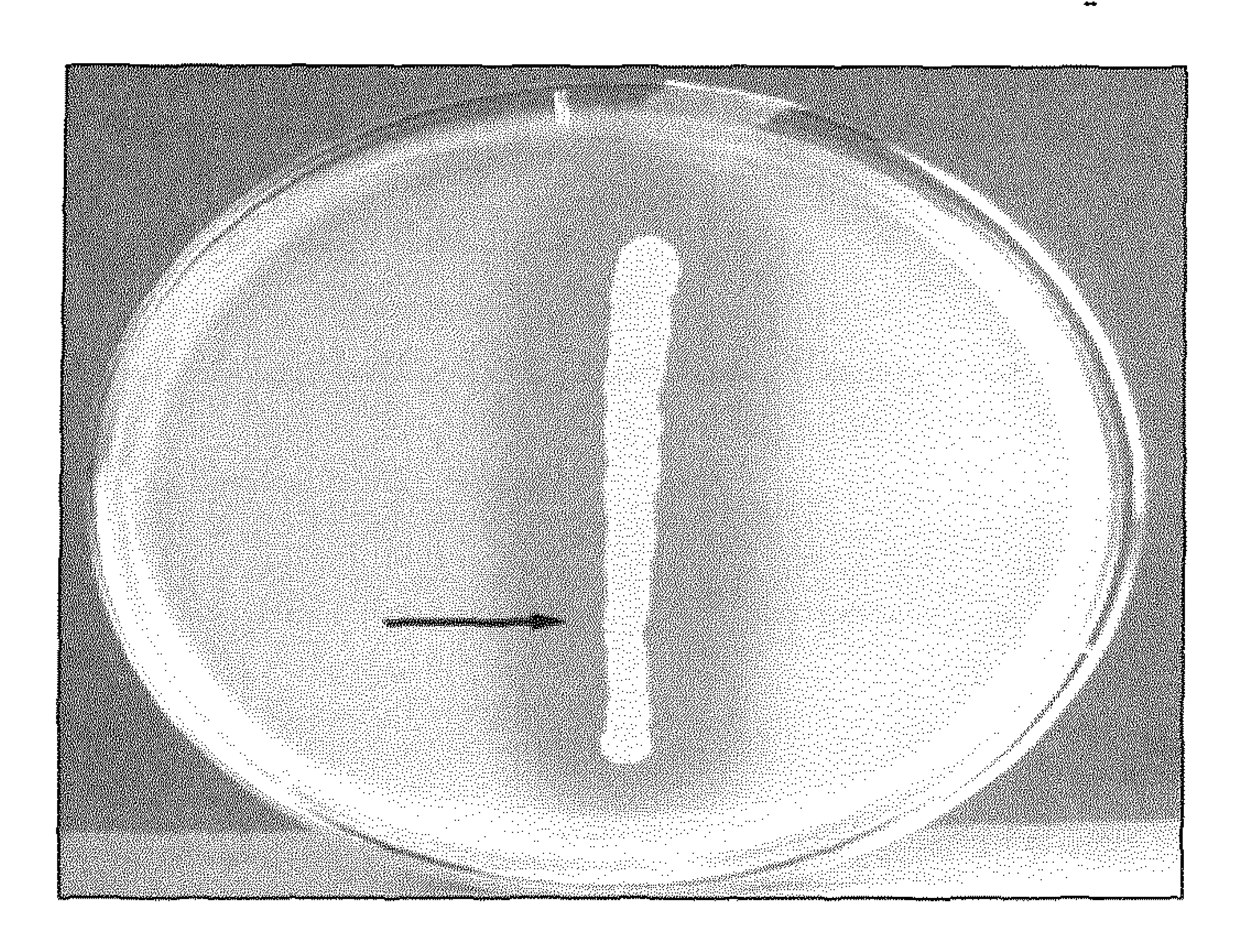
الهدف:

التعرف على قدرة البكتيريا على انتاج انزيم DNase.

طريقة العمل:

1. نصب وسط الاكار المغذي في طبق بتري ونضيف اليه الDNA.
2. يلقح الطبق بمزرعة بكتيرية حديثة العمر ويحضن عند 37م لمدة 24ساعة
3. يكشف عن تحلل الDNA باضافة (1N HCL) .

4. نسجل النتائج ،ان تكون مناطق شفافة حول النمو البكتيري دليل على ان البكتيريا انتجت انزيم DNase للوسط الخارجي وحللت مادة DNA في الوسط تعني النتيجة الموجبة للاختبار. **شكل (44)**



شكل (44) اختبار قدرة البكتيريا على انتاج انزيم DNase على وسط الاكار المغذي .

اسم التجربة:

استخدام نظام (API 20 E) في تصنيف وتعريف البكتيريا المعوية

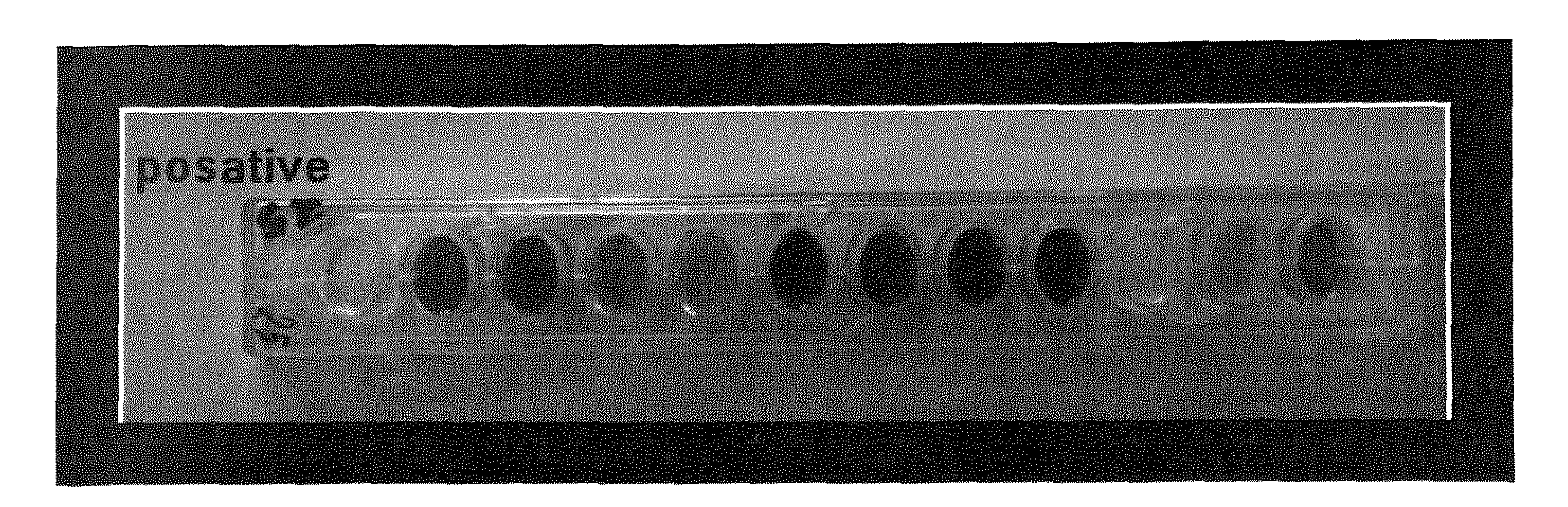
Analytical Profile Index System for Identification of Enterobacteriaceae

الهدف من التجربة:

التعريف السريع للبكتيريا المعوية على مستوى الجنس والنوع باستخدام نظام API تعتبر من اكثر الطرق القياسية والادق في تصنيف البكتيريا يحتوي على 20 تجويف صغير بها اوساط جافة ينتج عنها التفاعل الحيوي (تفاعلات الانزيمات الاصلية).

طريقة العمل:

1. بواسطة ابرة التلقيح المعقمة، ينقل من المزرعة البكتيرية الحديثة والنقية الى انبوبة بها ماء معقم وترج جيدا.
2. تملا التجاويف الموجودة في علبة تحضين الشريط بالماء، ثم يوضع الشريط الذي يحتوي على الاختبارت .
3. ينقل من المعلق البكتيري الى التجاويف الصغيرة مع اتباع التعليمات المرفقة مع الكت الخاصة بكل اختبار.
4. يغطى الشريط بالغطاء الخاص به ثم يحضن عند 37م لمدة 24 ساعة. **شكل(45)**
5. تضاف الادلة الخاصة باختبارات: TDA- IND- VP **جدول(4)**
6. تقرا النتائج مع تسجيلها.

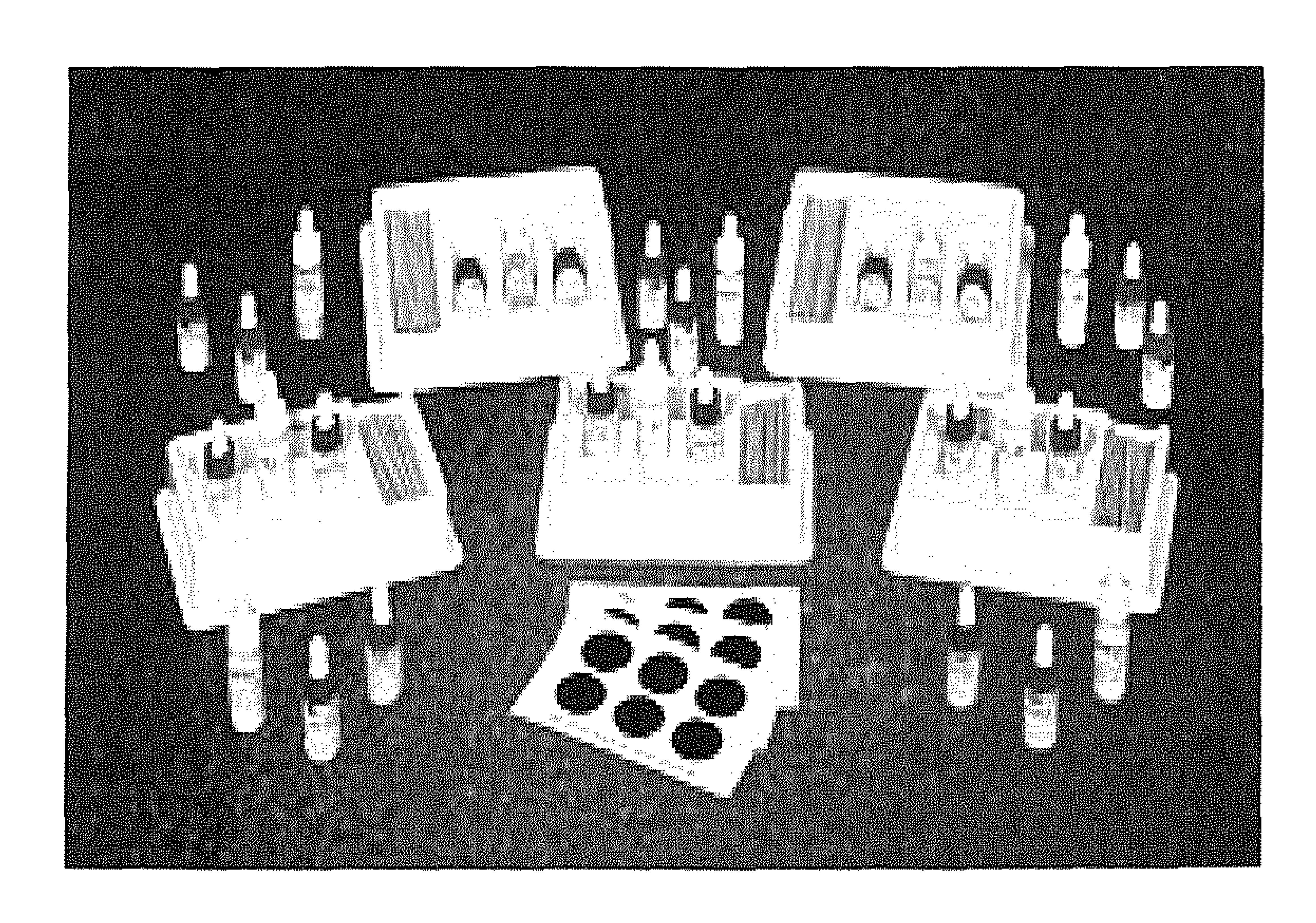


شكل (45) الشريط التعريفي بنظام تصنيف وتعريف البكتيريا المعوية

(API 20 E)

التصنيف السيرولوجي للبكتيريا Serological Identification

تستخدم التفاعلات المناعية لتصنيف العديد من البكتيريا، فالتخصص للتفاعلات الخاصة بالاجسام المضادة (يوجد في سيرم الدم) مع الانتيجين (يحفز تكوين الاجسام المضادة) يسمح بتصنيف البكتيريا المتشابهة تبنى انظمة الاختبارات السيرولوجية السريعة على خلط السيرم المضاد المعلوم مع كائن حي غيرمعلوم وملاحظة أي تفاعل يحدث تجمع agglutination للخلايا البكتيرية لوكانت الاجسام المضادة تكافي انتيجينات الكائن الغير معلوم. **شكل(46)**



شكل(46) العدة الخاصة التصنيف السيرولوجي للبكتيريا.

جدول(4) الادلة الخاصة باختبارات(READING THE API 20)

TESTS	SUBSTRATE	REACTION TESTED	- RESULTS	+ RESULTS
ONPG	ONPG	beta-galactosidase	colorless	yellow
ADH	arginine	arginine dihydrolase	yellow	red/orange
LDC	lysine	lysine decarboxylase	yellow	red/orange
ODC	ornithine	ornithine decarboxylase	yellow	red/orange
CIT	citrate	citrate utilization	pale green/yellow	blue-green/blue
H2S	Na thiosulfate	H2S production	colorless/gray	black deposit
URE	urea	urea hydrolysis	yellow	red/orange
TDA	tryptophan	deaminase	yellow	brown-red
IND	tryptophan	indole production	yellow	red (2 min.)
VP	Na pyruvate	acetoin production	colorless	pink/red (10 min.)
GEL	charcoal gelatin	gelatinase	no diffusion of black	black diffuse

GLU	glucose	fermentation/oxidation	blue/blue-green	yellow
MAN	mannitol	fermentation/oxidation	blue/blue-green	yellow
INO	inositol	fermentation/oxidation	blue/blue-green	yellow
SOR	sorbitol	fermentation/oxidation	blue/blue-green	yellow
RHA	rhamnose	fermentation/oxidation	blue/blue-green	yellow
SAC	sucrose	fermentation/oxidation	blue/blue-green	yellow
MEL	melibiose	fermentation/oxidation	blue/blue-green	yellow
AMY	amygdalin	fermentation/oxidation	blue/blue-green	yellow
ARA	arabinose	fermentation/oxidation	blue/blue-green	yellow
OX	oxidase	Oxidase	colorless/yellow	violet

ثاني عشر :الأسس المستخدمة في تعريف البكتيريا

أهم الأسس المستخدمة في تعريف وتصنيف البكتيريا هي:

1. **الصفات الظاهرية النظرية**Macroscopic morphology ومنها :الشكل العام للمستعمرة البكتيرية(الحجم – القوام-الصبغات -سرعة وطبيعة النمو في الوسط).
2. **الصفات الظاهرية المجهرية**Microscopic morphology ومنها - الشكل العام للخلية البكتيرية(عصوية، كروية،حلزونية...الخ)
   - صبغة كرام.
   - صبغة مقاومة للأحماض.
   - بالإضافة الى وجود الأسواط وموضعها، الأهداب، سمك الجدار.
3. **الخصائص البيوكيميائية والفسيولوجية:**
   - وتشمل الخصائص الإنزيمية مثل:
   - تحليل السكريات
   - القدرة على تحليل بعض المركبات الكيميائية و البروتينات.
   - الإستجابة لتأثير المضادات الحيوية(حساسة، مقاومة.
4. **التحليل الكيميائي :**

   كتحليل مكونات الجدار الخلوي والغشاء الخلوي.
5. **التحليل المصلي(السيرولوجي:)**

   التفاعل بين الأجسام المضادة

Antibodiesوالأنتجين Antigens لتعريف الأنواع البكتيرية.

6. تحليل الحامض النووي :

دراسة تعاقب وترتيب النيوكليوتيدات في الحمض النووي.

الهدف من تقسيم البكتيريا .

1. لتسهيل الدراسة.
2. للتعريف والتمييز بين الأنواع والأجناس.
3. للإستفادة منها في المجالات التطبيقية.
4. تقسيم(نظام بيرجي)وهو مفتاح تقسيمي(...شكل البكتيريا الظاهري، صبغةكرام، الأهداب.
5. النظام المبني على تقسيم البكتيريا الى مجموعات اعتماداً على مقارنة وترتيب القواعد النيتروجينية للحمض النووي RNA وفي هذا التقسيم **فقد تم تقسيم البكتيريا الى احدى عشر فرع مستقل في شجرة Eubacteriaومنها:**

- البكتيريا الحقيقية الموجبة لصبغة جرام(*Bacillus, Actinomycetes*)
- البكتيريا الحقيقية السالبة لصبغة جرام(*Pseudomonous*)
- البكتيريا التمثيلية المحتوية على صبغة الكلوروفيل أ*Cyanobacteria*
- البكتيريا الحلزونيةSpirochetes
- البكتيريا المتبرعمة

التقسيم المبني على تحليل الحامض النووي الريبوسومي rRNA

ثلاث مجموعات هي:

- البكتيريا القادرة على تصنيع الميثان .
- البكتيريا المحبة للملوحة .
- البكتيريا المحبة للحرارة العالية.

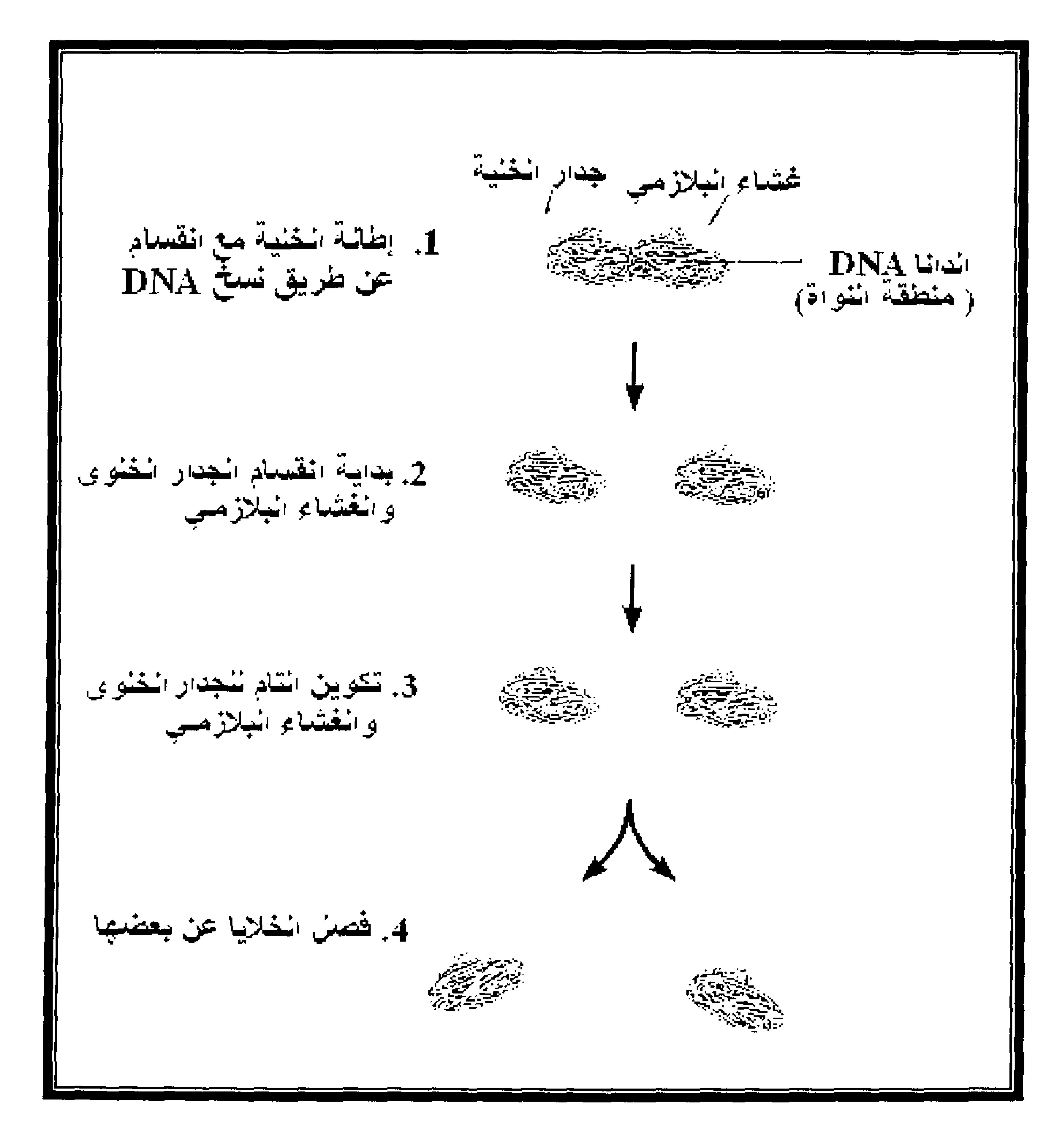
الانقسام الثنائي البسيط

تبدأ خلية البكتيريا في النمو بالدالة الآسيةExponentially **جدول (5).**

جدول(5) تكاثر الخلايا البكتيرية عن طريق التقسيم الثنائي.

عددالخلايا	قوة الدالة الأسية	عدد الخلايا بدالة الأسية
1	02	*
2	12	**
4	22	****
8	32	********
16	42	****************
32	52	********************************

تنقسم كل خلية بطريقة الانقسام الثنائي البسيط، بمجرد نقلها على الوسط الزرعي **الشكل (47).**



شكل (47) الانقسام الثنائي البسيط لخلية بكتيرية .

ثالث عشر : عزل الفطريات: Isolation of fungi

الفطريات تتواجد في كل مكان من اليابسة والماء والمناطق المتجمدة في القطبين الشمالي و الجنوبي كما هي موجودة في خط الاستواء والمناطق المعتدلة وتوجد على ارتفاع آلاف الأمتار في الجو وعلى عمق عدة أمتار تحت سطح التربة وتوجد ملتصقة أو متطفلة على الأجزاء النباتية و الحيوانية وتخلو منها فقط المناطق الملتهبة وفوهة البراكين وكذلك المناطق والمواد المعقمة بأجهزة التعقيم.

الهدف الحقيقي لعزل الفطريات قد يعزى إلى عدة أسباب:

1. التعرف الحقيقي على المحتوى الكمي والنوعي للفلورا الفطرية وتنوعها وترددها وسيادة أنواعها وخصوصاً في الترب الزراعية.
2. تشخيص الفطريات المرضية عن الفطريات المترممة الأخرى.
3. الحصول على مزارع نقية Pure cultures للفطريات المعزولة من المكان المراد العزل منه.
4. لأجراء العديد من الدراسات العلمية عليها كالتضاد والحساسية والأمراضية وغيرها.

المتطلبات الاساسية لغرض نمو الفطريات هي:

1. أوساط زرعيه مناسبة وملائمة لنمو وتكاثر الفطريات.
2. توفر أجهزة حضن Incubators لحضن الفطريات وهذه الأجهزة توفر كل الظروف المناسبة من درجة حرارة وتهوية والرطوبة إضافة إلى الإضاءة.
3. كما تتطلب عملية عزل الفطريات إلى السيطرة على تواجد أحياء أخرى مثل البكتيريا والفطريات المترممة التي قد تتداخل مع الغاية من عملية

العزل وعلى هذا الأساس يجب أن تكون الأطباق والماصات والماء وغرفة العزل معقمة كلياً كما يضاف إلى الوسط ألزرعي بعض المضادات الحيوية مثل Chloramphenicol أو القليل من مادة Rose Bengal لمنع نمو البكتيريا والتقليل من نمو بعض الفطريات.

اسم التجربة :

عزل الفطريات من التربة بطريقة التخفيف.

الهدف من التجربة :

لفحص الفطريات والتعرف على أشكالها .

طريقة العمل:

1. اخذ عينة من التربة بوزن اغم.
2. ثم تجفف التربة وتقدر نسبة الرطوبة فيها .
3. نأخذ 1غم من عينة التربة الجافة ويضاف إلى 9 مل من الماء المعقم ثم يرج جيداً حتى يصبح متجانساً فيكون عندنا التخفيف 1\10.
4. ثم نأخذ 1مل بواسطة ماصة معقمة من التخفيف السابق إلى أنبوبة اختبار تحوي 9مل من الماء المعقم فيصبح التخفيف 1\100 وتكرر العملية نفسها بالنسبة للتخفيف 1\1000 ثم 1\10000 ثم 1\100000مع ملاحظة استخدام ماصة معقمة عند إجراء كل تخفيف). شكل(48).
5. بعد إجراء عملية التخفيف هذه ينقل 1مل من التخفيف الأخير أو الذي قبله أو بتخفيف مطلوب عزل الفطريات منه بواسطة ماصة معقمة ويوضع في طبق معقم ثم يصب عليه 18مل تقريباً من الوسط ألزرعي PDA المبرد

إلى درجة 45°م (مع ملاحظة أن تكون درجة حموضة الوسط ألزرعي 5.8 – 6.5)

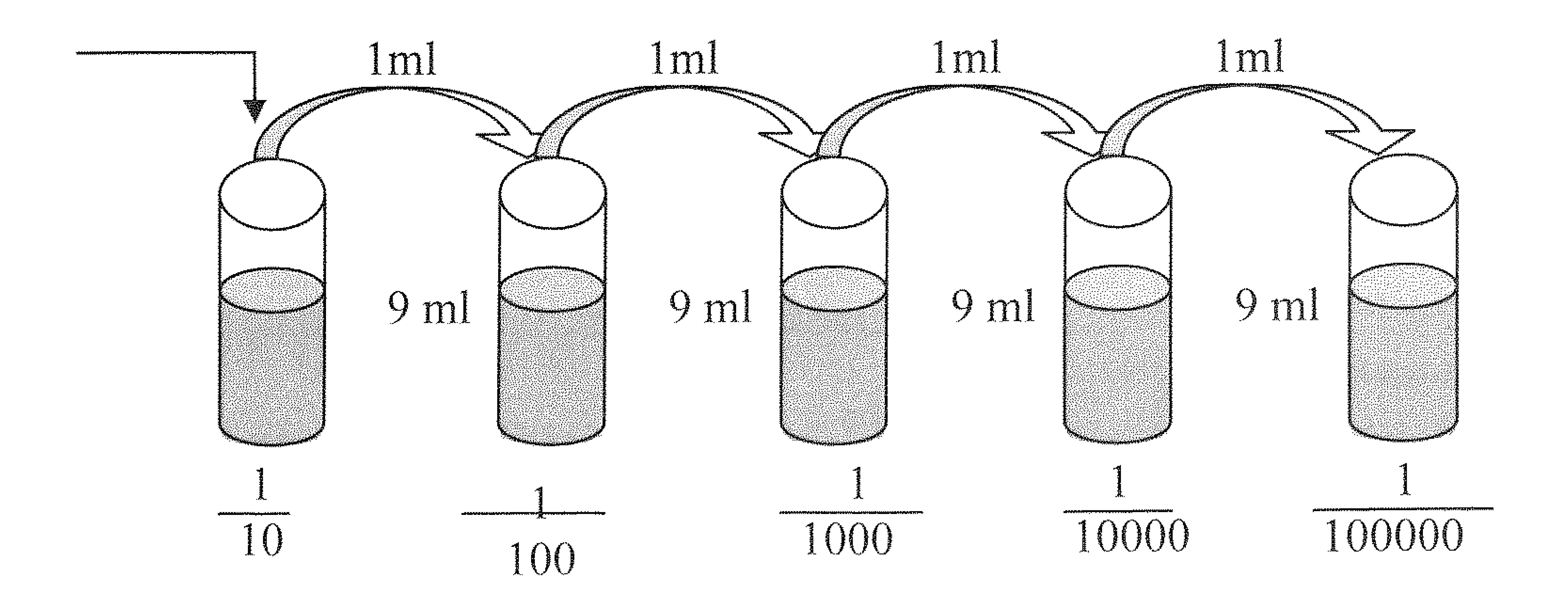
6. ثم يرج الطبق بحركة دائرية لغرض التجانس وبعد أن يتصلب يحضن بدرجة (25- 28°م) لمدة (5 – 7) أيام ثم تشخص الفطريات الموجودة في الطبق:

ملاحظة :

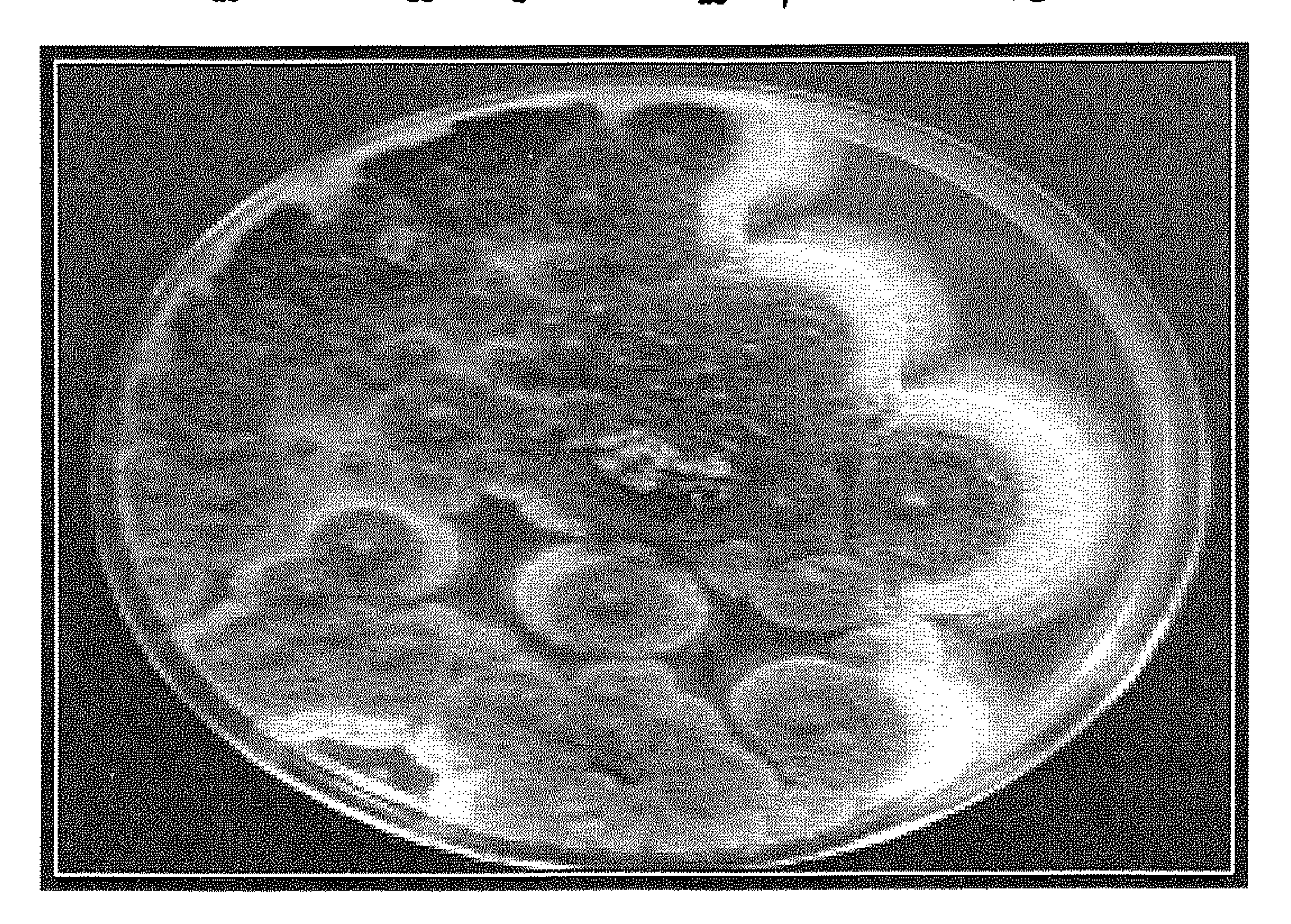
عدد الفطريات في 1غم تربة = معدل عدد المستعمرات في الأطباق المستعمل.

Xمقلوب التخفيف

7. حضري شريحة نظيفة وضعي في وسطها نقطة من الاكتوفينول.
8. خذي جزء من النمو الفطري بإبرة الفطر ذات الرأس المدبب وضعيه على نقطة الاكتوفينول مع فرده برفق.
9. تغطى نقطة الاكتوفينول مع مافيها من الفطر بالغطاء الزجاجي.
10. تفحص الشريحة بإستخدام القوة 10 أولا ثم بالقوة 40شكل (49)



شكل(48)استخدام طريقة التخافيف لزراعة الفطريات.



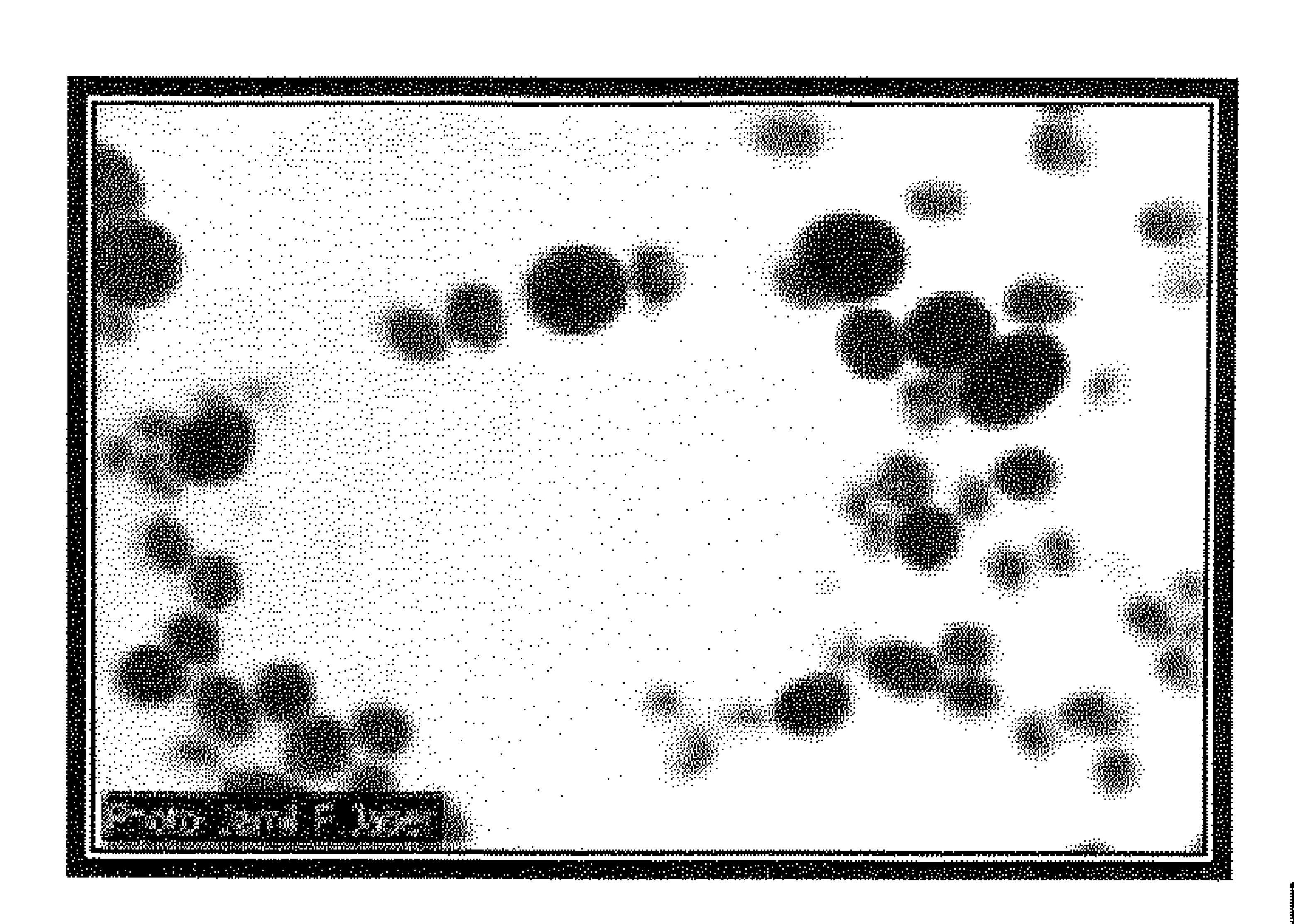
شكل (49) زراعة الفطريات على وسط P D A.

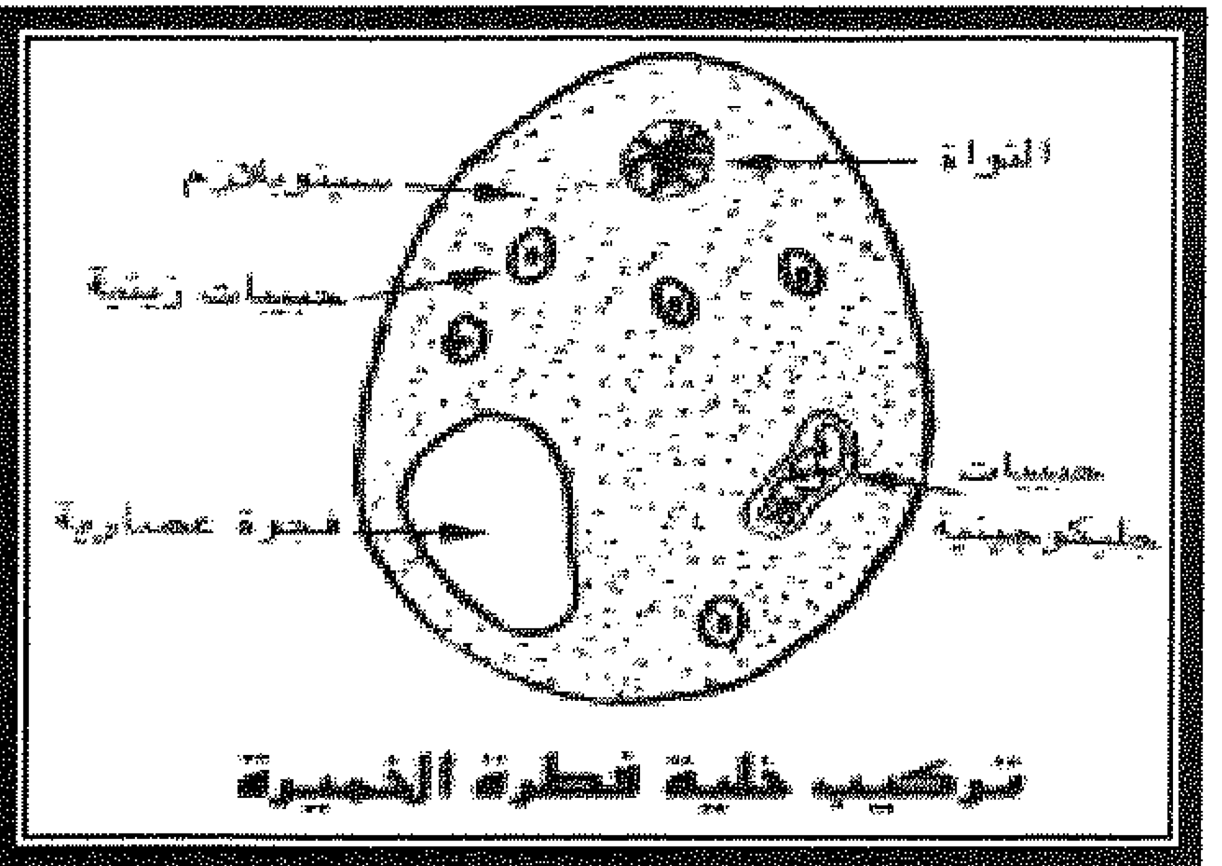
اسم التجربة:

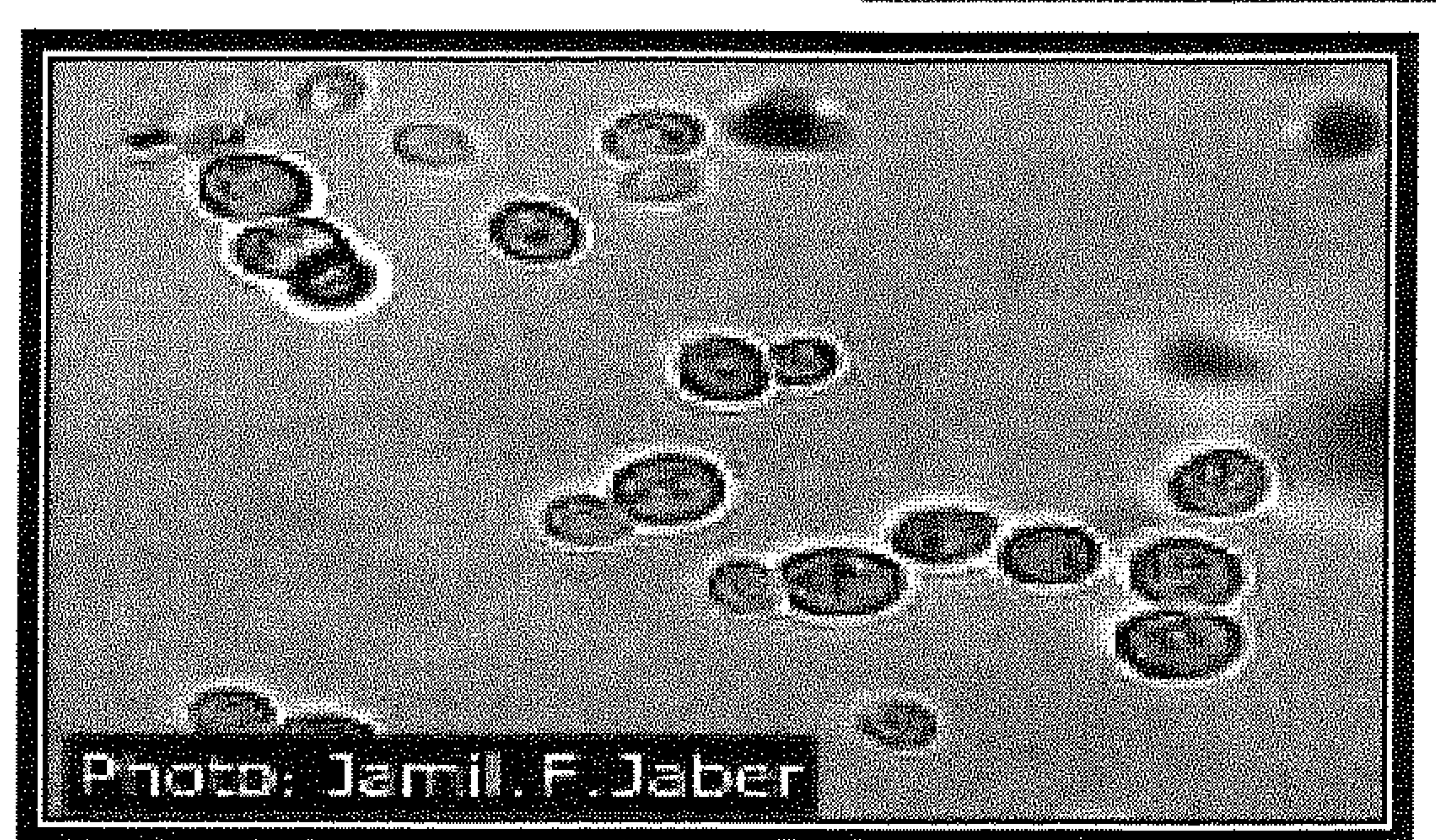
زراعة الخمائر yeasts

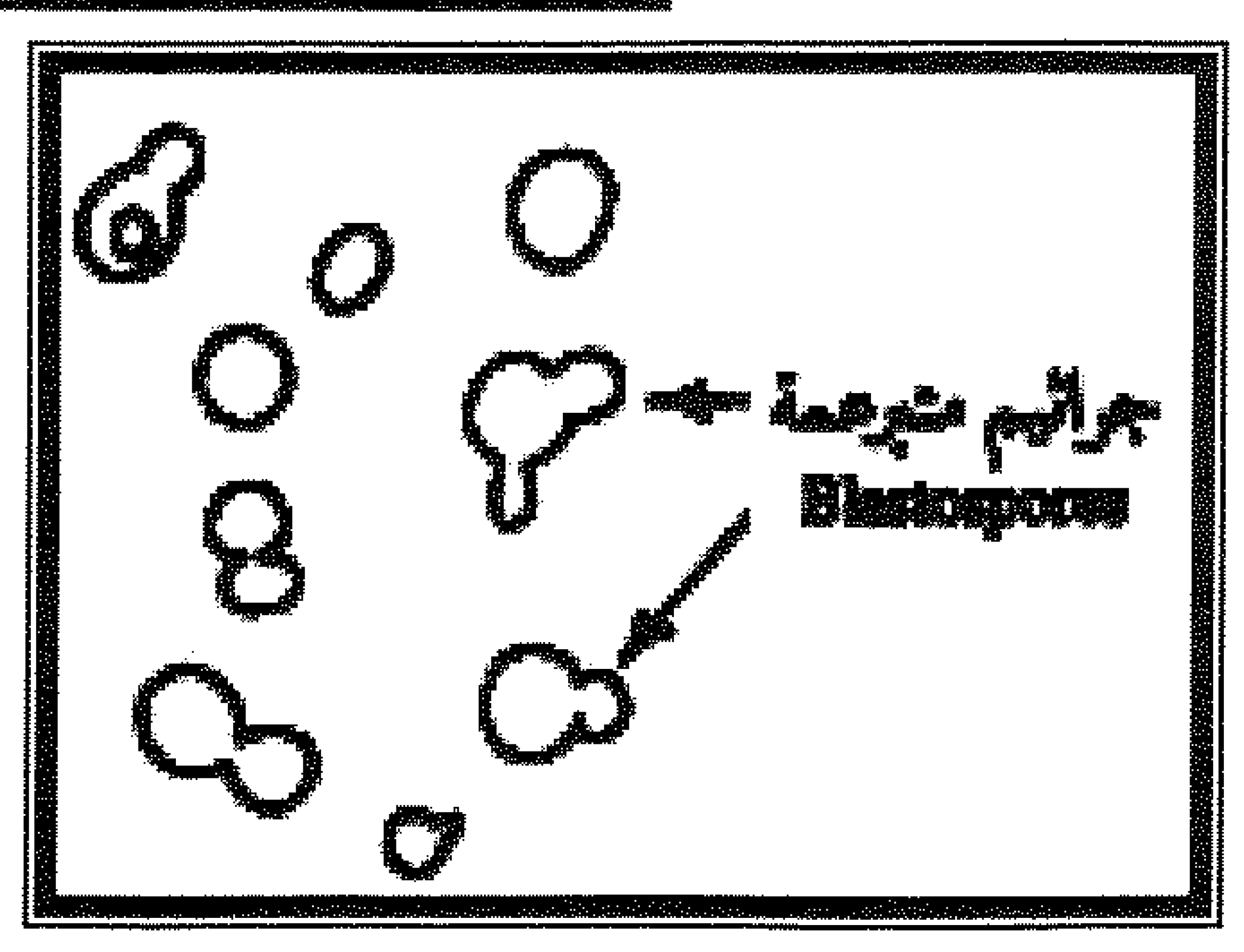
طريقة العمل:

1. نعمل غشاء من الخميرة وذلك بأخذ ملء عقدة بالإبرة ذات العقدة من الخميرة النامية في وسط سائل ونوزعها في مساحة 1سم2 في منتصف شريحة نظيفة ثم نجففها بالمنطقة الساخنة بأعلى اللهب .
2. ونصبغه بأزرق المثيلين أو الصفرانين 0,5- 1 دقيقة.
3. ثم نغسل الصبغه بتيار ماء خفيف ونجفف، والفحص يكون بالعدسة الزيتية.
4. نفحصه مع الرسم **شكل (50)**.









شكل(50) انواع مختلفة من الخمائر تحت المجهر.

اسم التجربة :

زراعة الفطريات من الهواء

الأدوات والمواد

طبق بتري يحتوي على وسط البطاطا + حاضنة

خطوات العمل

1. يتم تعريض طبق بتري المحتوي على وسط لنمو الفطريات للهواء لمدة من الزمن
2. يوضع الطبق في الحاضنة لمدة من ٤- 7 أيام لنمو الفطريات.
3. عند نمو الفطريات يمكن أن تحتفظ بها في الثلاجة

اسم التجربة:

التعرف على أنواع الفطريات الموجودة في أطباق بتري

الأدوات والمواد

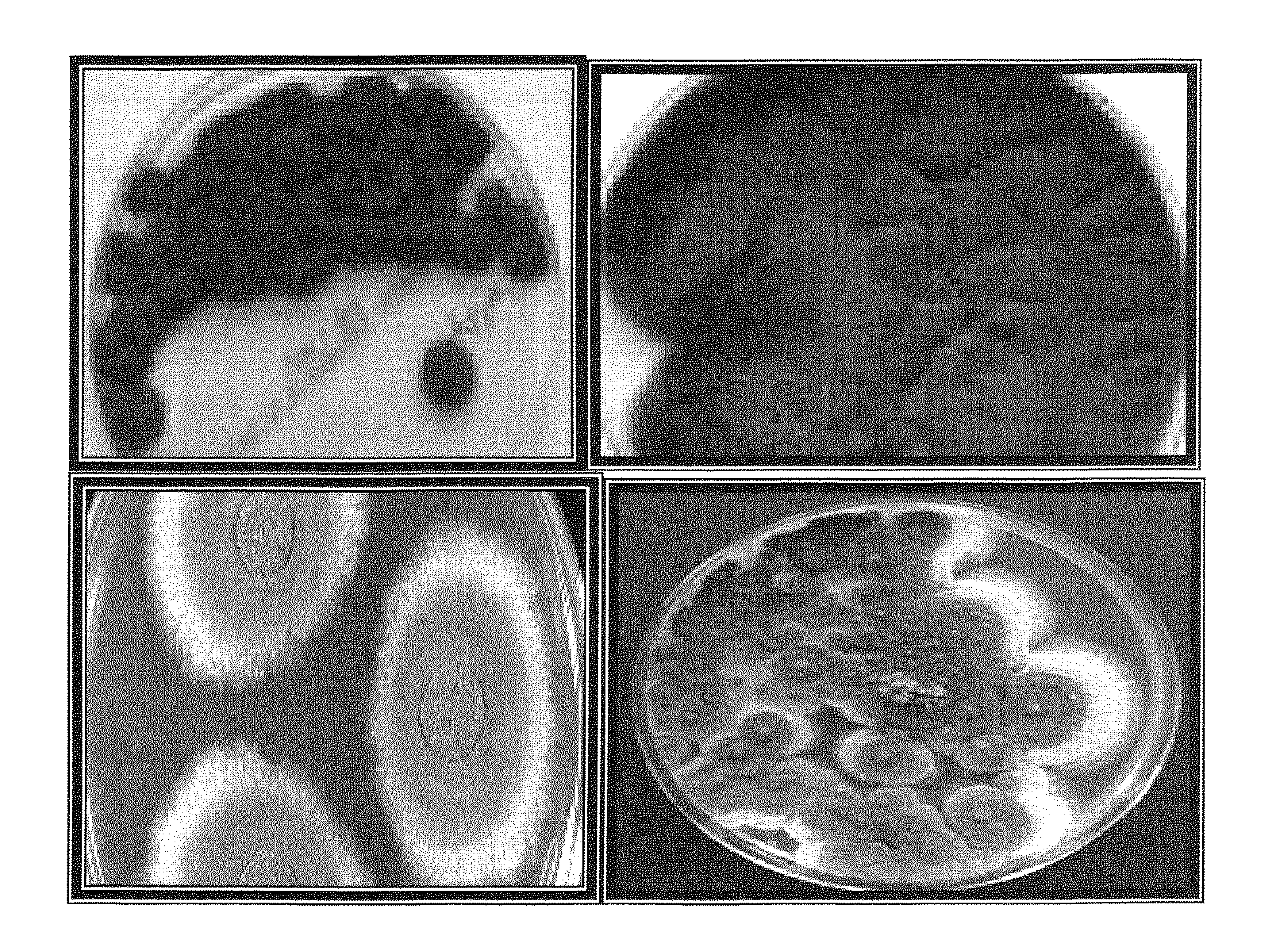
طبق بتري يحتوي على فطريات نامية + لهب + ماء مقطر + إبرة تلقيح + شرائح جديدة + أغطية شرائح

خطوات العمل

1. يمكن فحصها للتعرف على الأنواع التي نمت وذلك بأخذ جزء بسيط بواسطة إبرة التلقيح.
2. توضع على شريحة زجاجية .
3. يضاف إليها نقطة من الماء المقطر ثم تغطى بغطاء الشريحة.

4. يتم فحصها تحت المجهر للتعرف على الأنواع المختلفة. **شكل(51)**

5. **5**دراسة بعض شرائح الفطريات الجاهزة.



شكل(51) انواع مختلفة من الفطريات مزروعة على وسط البطاطا .

رابع عشر: القياس الميكروسكوبي للكائنات الحية الدقيقة

تتفاوت الأحياء الدقيقة في الحجم تفاوتا كبيرا فمنها مايمكن تمييزه بالعين المجردة مثل بعض أنواع الفطريات ومنها المتناهية في الصغر مثل(البكتيريا)حيث يستخدم المجهر لدراستها ، ولدراسة أبعاد البكتيري اهناك طرق خاصة تعتمد على الدقة المتناهية ووحدة القياس هو الميكرون(1/100من المليمتر).

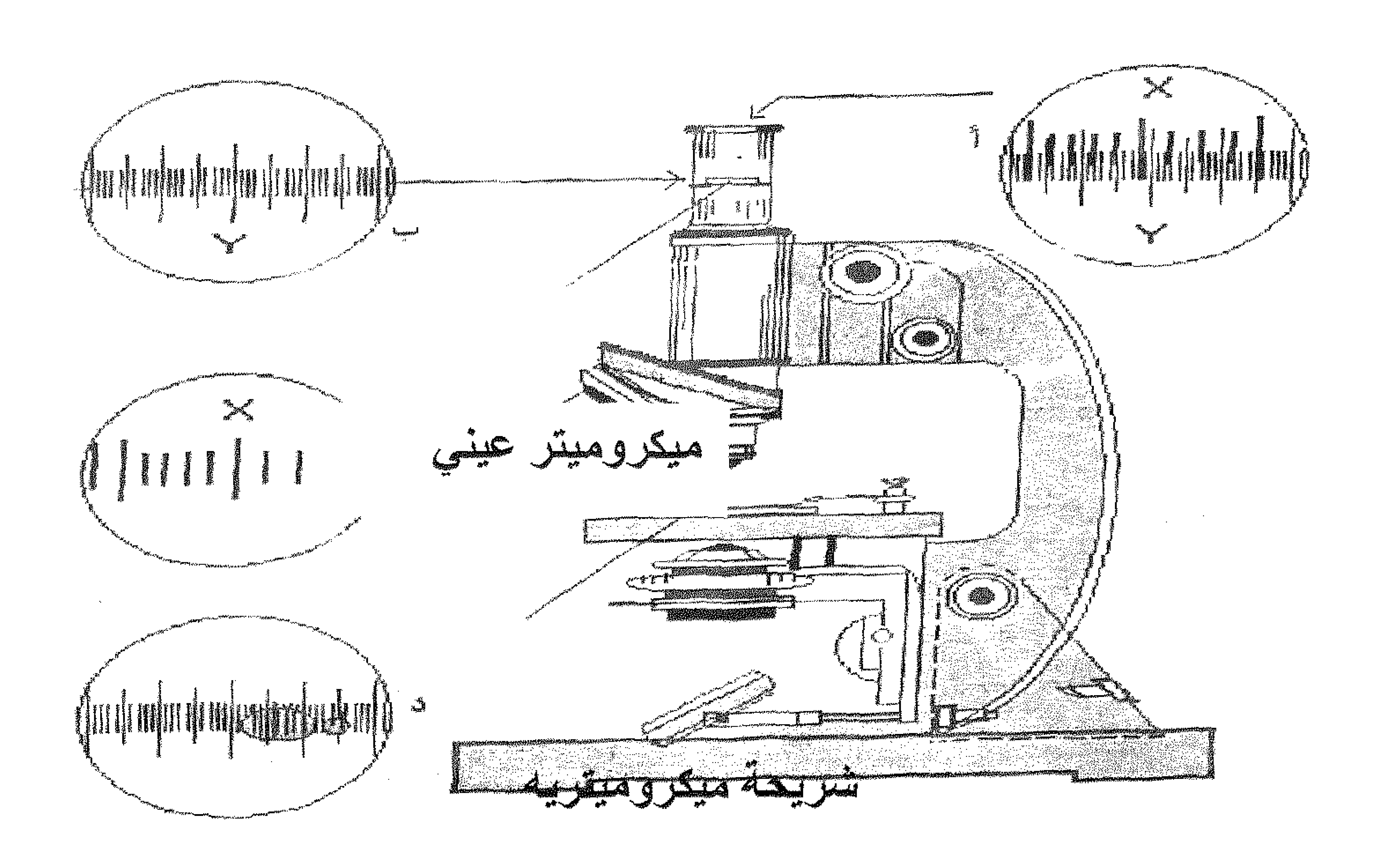
القياسات المجهرية

عندما تزود العدسة العينية بقرص يوضع في مكان مخصص له داخل العينية بعد فتحها وهذا القرص مدرج تدريجاً دقيقاً ويعرف بالميكروميتر العيني Ocular micrmeter فإن الفاحص يمكنه أن يجرى قياسات دقيقة بعد معايرة أقسام الميكروميتر العيني بالاستعانة بالميكروميتر الشيئي المدرج تدريجاً معلوماً وتتم بها قياس البكتيرات كما سيأتي فيما بعد وتعتبر هذه القياسات (طول أو عرض) من الصفات التقسيمية الهامة للكشف عن التنوعات أو الاختلافات التي تطرأ على طول وعرض الكائن الدقيق إذا ما حدث ما يدعو إلى ذلك من ظروف بيئية. وهي أيضاً تتبع القياس حجم الجراثيم التي ينتجها الكائن سواء كانت داخلية أم خارجية وكذلك في قياس الحوامل الجرثومية إن وجدت وشكل 12 يبين التدريجات التي تشاهد في العدسة العينية للميكروميتر العيني وكذلك تلك التي تشاهد على الميكروميتر الشيئي Stage micrometer وأخرى تبين تطابق التدريجيين والتعرف على هذه التطابقات كمياً.

الخطوات العملية

1. يوضع الميكروميتر العيني في العدسة العينية وذلك يفصل الجزء العلوي منها ثم يوضع الميكروميتر بأنبوبتها مركزاً على المكان المخصص له ثم يعاد تركيب الجزء العلوي إلى مكانه.
2. ضع الميكروميتر الشيئي Stage micrometer وهو عبارة عن شريحة على مسرح الميكروسكوب ثم حاول مشاهدة تقسيماتها بالعدسة الصغرى (التدريجات توجد بداخل دائرة سوداء) ثم ثبت الشريحة بالماسكين.
3. حرك القطعة الأنفية للمجهر لتجهيز الشيئية الكبرى للاستعمال حرك الضابط الدقيق حتى ترى التقسيمات بوضوح.
4. ضع نقطة من زيت السيدر على الشريحة الميكرومترية ثم حرك القطعة الأنفية لتستحضر العدسة الزيتية.حرك الضابط الدقيق حتى تنغمس الشريحة وترى أقسام التدريجين.
5. حدد عدد أقسام الميكروميتر العيني المساوية لعدد أقسام الميكروميتر الشيئي (يلاحظ ضرورة انطباق خطوط التدريجين على أبعد مسافة ممكنة) قدر عدد أقسام الميكروميتر العيني التي تقابل عدد أقسام الميكروميتر الشيئي في المنطقة المختارة.
6. وعادة يكون مسافة القسم الواحد من أقسام الشريحة الميكرومترية (الشيئية)مدوناً عليها وهو في غالبية الأحوال يكون مساوياً 01, من الملليمتر أي 10ميكرون وعلى ذلك يمكن تقدير طول التدريج الواحد من الميكروميتر العيني باستعمال العدسة المغمورة بالزيت وإذا تساوى 3أقسام من الميكروميتر الشيئي مع عدد 20جزء من الميكروميتر العيني فالقسم الواحد من العينية = 3×01, /20 =0015, ملليمتر أو 1,5 ميكرون.

7. ارفع الشريحة ونظفها جيداً من الزيت وأحفظها في مكانها المخصص ثم ضع الشريحة المراد دراستها مكانها وعليها نقطة من الزيت السيدر وحرك الضابط الدقيق حتى ترى ما تود قياسه.
8. حدد طول الجراثيم أو الخلايا بتقدير عدد أقسام الميكروميتر العيني المساوي للجزء المراد قياسه. **شكل(52)**



شكل(52): يوضح كيفية أجزاء عملية معايرة أقسام الميكروميتر العيني.

- **بداية المعايرة ويلاحظ كل من تدريج الميكروميتر العيني (Y) وتدريج الشيئي (X).**
- **تدريج الميكروميتر العيني.**
- **تدريج الميكروميتر الشيئي.**

خامس عشر : تجربة تحديد منحني النمو القياسي في البكتريا .

المواد اللازمة:

1. Escherichia coli بعمر 10- 12 ساعة، المنماة على الوسط الزرعي السائل Tryptic Soy Broth (TSB).
2. جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer.
3. أطباق زجاجية حاوية على الوسط الزرعي لغرض عدّ البكتريا .
4. ماصة معقمة سعة 1 مل وأنبوبة اختبار معقمة حاوي على 9 مل من المحلول الملحي الفسلجي.
5. مسطرة.
6. دوارق زجاجية سعة 250 مل حاوية على الوسط الزرعي Nutrient Broth (N.B) او (T.S.B)

طريقة العمل:-

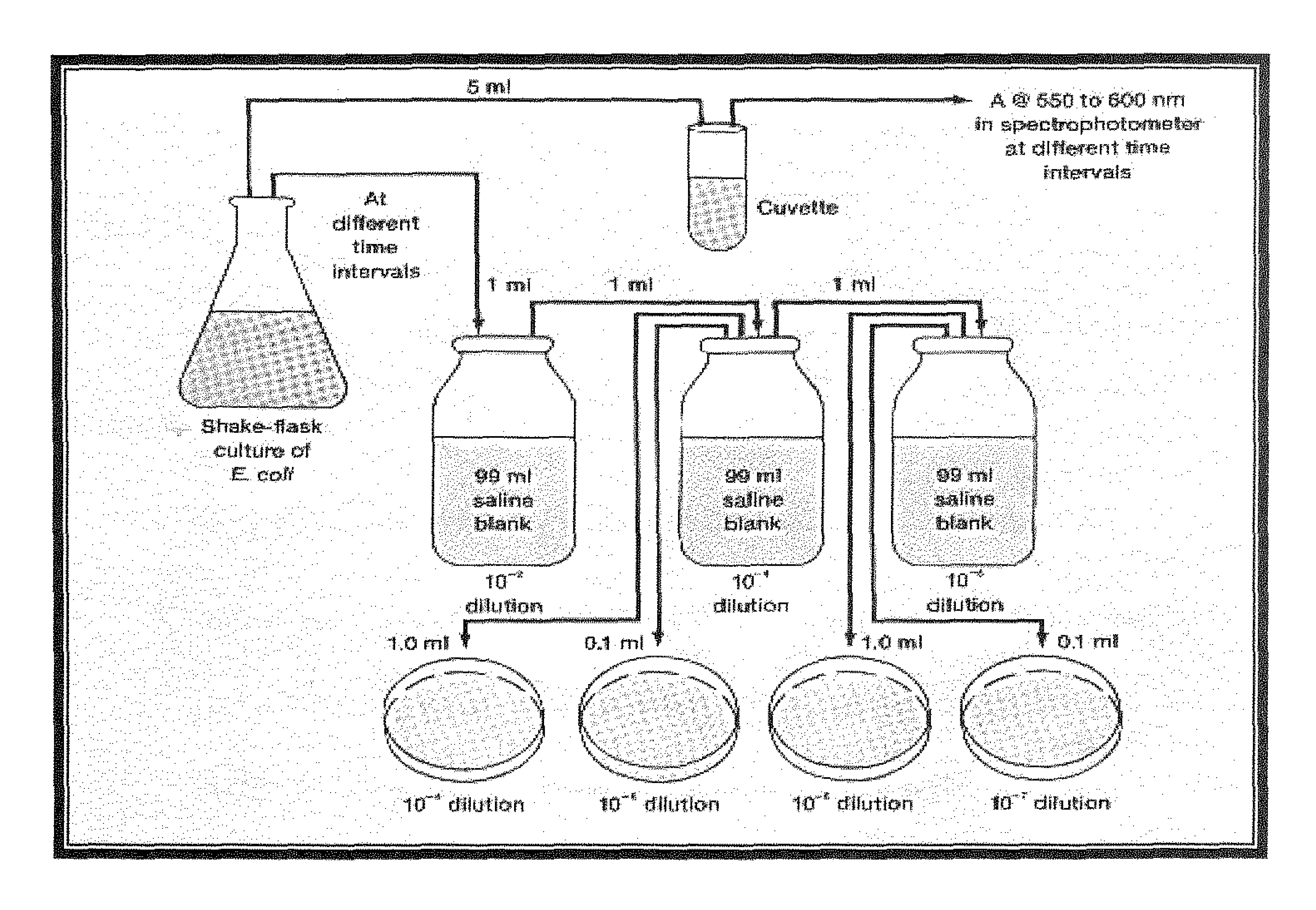
1. تنقل البكتريا ***E.coli*** إلى الدوارق الزجاجية الحاوية على الوسط الزرعي السائل **Nutrient Broth** او **Tryptic Soy Broth**.
2. تحضن الدوارق الزجاجية في درجة حرارة 37 م .
3. يضبط جهاز **Spectrophotometer** على طول موجي معين (الطول الموجي الذي يعطي أعلى امتصاص للزرع البكتيري واقل امتصاص للوسط الزرعي) وهو عادة **(550- 600)** نانوميتر.
4. يعتبر الوسط الزرعي المعقم الغير ملقح بمثابة المحلول الكفئ **Blank** ويتم تص الجهاز به قبل كل قراءة.

5. يحدد الوقت 0 هو الوقت الذي يتم قراءة النمو له بعد أول تلقيح للبكتريا للوسط الزرعي السائل ثم يتم اخذ قراءات لنمو البكتيري في الجهاز بعد مرور (30 ، 60 ، 90 ، 120 ، 150 ، 180) دقيقة و 14 ساعة من الحاضنة والقراءة الأخيرة يتم عمل تخفيف لها (1 مل لكل 9 مل) شكل (7). (يجب رج الوسط الزرعي جيداً قبل كل قراءة لمزج محتويات الوسط وان يتم العمل في ظروف معقمة).

6. يمكن ان يتم عدّ البكتريا أيضا، بأخذ 1 مل من الوسط الزرعي الملقح وزرعه بطريقة النشر او الصب، مباشرة بعد اخذ القراءة لكل فترة زمنية في جهاز المطياف الضوئي. وفي حالة الوسط الزرعي الكثيف يتم استخدام طريقة التخافيف، بعدها تعد المستعمرات النامية بعد حضن الأطباق في درجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة شكل (8).

7. يتم رسم منحني النمو للبكتريا بحيث يمثل المحور (X) قراءة الامتصاصية ويمثل المحور (Y) الوقت بالدقائق ويمكن إدخال عدد البكتريا / مل ضمن المخطط شكل (53)

8. يتم إيجاد زمن الجيل عن طريق المعادلة .



شكل (53) تحديد منحني النمو في البكتريا مختبرياً

$$\text{Generation time} = \frac{0.301\ t}{\text{Log } 10\ N\ t - \text{Log } 10\ N_0}$$

او عن طريق المخطط او الرسم البياني اعتماداً على:-

Generation time = t (A of 0.4 or any point) – t (A of 0.2 or any point)

سادس عشر :عزل البكتيريا

اسم التجربة:

عزل البكتيريا من مصادر مختلفة Isolation of Bacteria from Different

الهدف من التجربة:

التعرف على مدى انتشار البكتيريا في البيئات الطبيعة المختلفة.

- عند تعريض وسط غذائي (مثل الاكار المغذي) معقم للهواء الجوي أو نقل إليه مقدار من معلق تربة ثم وضع الطبق في حضان incubator عند درجة حرارة مناسبة لفترة زمنية معينة، يمكن ملاحظة عدد من المستعمرات الميكروبية نامية على سطح الوسط (قد تكون مستعمرات لبكتيريا- فطريات- اكتينومايسيتات..).
- هذه النتيجة تعتبر مؤشر واضح ومباشر لانتشار الأحياء الدقيقة بالطبيعة
- عند اجراء مثل هذه التجربة لابد من تعقيم الوسط والادوات المستخدمة وتجنب تلوثها وذلك باتباع الطرق البكتيريولوجية الصحيحة أثناء العمل.

الأدوات المطلوبة:

أطباق بتري محتوية علىوسط الاكار المغذي المعقمة والجاهزة للعزل

مسحات قطنية معقمة Cotton Swabsكحول 70٪- ديتول 50٪-

قطن- لهب بنزن- ابر تلقيح- مقص- ملقط.

طريقة العمل:

1. كل مجموعة تأخذ 3 أطباق بتري محتوية على وسط الاكار المغذي المعقم الجاهز للاستخدام، وعلى حافة الطبق السفلية تدون المعلومات

الخاصة بالمجموعة (مصدر العزل حيث أن كل مجموعة سوف تعزل من مصدرمعين وتعزل من عينة بكتيرية معروفة - رقم المجموعة- تاريخ العمل). ويستخدم الطبق الثالث للمقارنة Control .

2. تعقم طاولة العمل Bench بالديتول 50٪ ويتم تشغيل اللهب قبل العمل بعشر دقائق تقريبا.

3. عند العزل من الهواء الخارجي أو جو المعمل، يفتح الطبق المحتوي على الاكار المغذي في الجو لمدة من 10- 15 دقيقة ثم يغطى الطبق بعد فترة التعريض.

4. للعزل من (ماء الحنفية- ماء المجاري- معلق التربة- اللبن- الماء المعدني) تحت ظروف التعقيم وباستخدام اللهب المباشر تعقم ابرة التلقيح ذات العقدة ثم ينقل مقدار مليء عقدة من كل مصدر على حده ثم ينشر على سطح الاكار المغذي بطريقة التخطيط البسيط.

5. للعزل من (أرض المعمل- الأنف- اللعاب – فروة الرأس) يستخدم ممسحة قطنية Cotton swab معقمة مبللة بماء معقم ويؤخذ عينة من مصادر مختلفة على حدة وتوزع على سطح الوسط وذلك تحت ظروف التعقيم

6. للعزل من (الجلد- الأظافر- والشعر) يؤخذ عينة من الشعر بواسطة ملقط أو مقص معقم بالتلهيب الكحولي ووضعها على الطبق، وأخذ عينة من الأظافر ووضعها في طبق أخر، وبالنسبة للجلد يمكن لمس سطح البيئة بطرف الاصبع أو بواسطة المسحة القطنية.

7. للعزل من المكسرات أو البذور، يمكن وضع حبة بذرة أو مكسرات بواسطة ملقط معقم ووضعها على الوسط.
8. تحضن الأطباق مقلوبة عند درجة حرارة 25- 37 °م لمدة من 24- 48 ساعة.
9. تفحص الأطباق .

- وصف أشكال المستعمرات البكتيرية وطبيعة نموها ولونها.
- تدون الملاحظات وتكتب النتائج في الجدول المرفق.

سابع عشر: المضادات الحياتيةAntibiotics

هي مواد كيميائية عضوية تنتجها الكائنات الدقيقة ومنها بعض انواع الفطريات وانواع محددة من البكتريا، وتقوم بقتل كائنات دقيقة أخرى مثل البكتيريا

لها أهمية في علاج الأمراض الميكروبية Infectious Diseases، حيث تستعمل كنوع من المواد الكيماوية الطبيعية العلاجية **Natural Chemotherapeutic agents**

الية عمل المضادات

تقسم المضادات الحياتية من حيثفعلها المضاد للجراثيم الى قسمين:

مثبطة لنمو الجراثيم Bacteriostatic قاتلة للجراثيم Bactericidal

(مثل مضاد: الايريثرومايسين) (مثل مضاد: البنسيلين).

مقاومة البكتريا للمضادات الحياتية Antibiotics Resistance

تعتبر من أهم الصعوبات التي تجابه الطبيب في معالجة الأمراض لقد ثبت أنه لايوجد مضاد إلا وتوجد هذه الظاهرة معدلات المقاومة تختلف من مضاد لآخر ومن كائن دقيق لأخر.

وسائل مقاومة البكتريا للمضادات الحياتية.

الطرق التي يمكن للبكتيريا أن تقاوم الفعل الضار لمضادات الحياة:

1. بعض أنواع البكتيريا تنتج أنزيمات تكسر المضاد وتوقف فعاليته مثل أنزيم Penicillinase

2. بعض البكتيريا تفرز أنزيمات تغير التركيب الكيميائي للمضاد وبذا يفقد فعله المؤثر.

3. تغير النفاذية الغشائية لخلايا البكتيريا مما يعيق دخول المضاد.

4. تغير البكتيريا طبيعة بعض مكوناتها التي يستهدفها المضادمما يمنع ارتباط المضاد بهدفه.

اسس مقاومة البكتريا لمضادات الحياة

تشارك العديد من العوامل التي تحملها الجراثيم في الفعل المقاوم للمضاد وتكون هذه المقاومة على عدة اشكال :

- المقاومة الطبيعيةIntrinsic Resistance
- المقاومة بواسطة الطفراتResistance by Mutations
- المقاومة بواسطة البلازميدات Resistance by Plasmids

بعض الصفات الواجب توافرها في مضادات الحياة:

1. يجب أن لا تحدث تأثيرات جانبية Side effect بجسم العائل، مثل: الحساسية.

2. أن لا تقضي على الميكروفلورا الطبيعية للعائل.

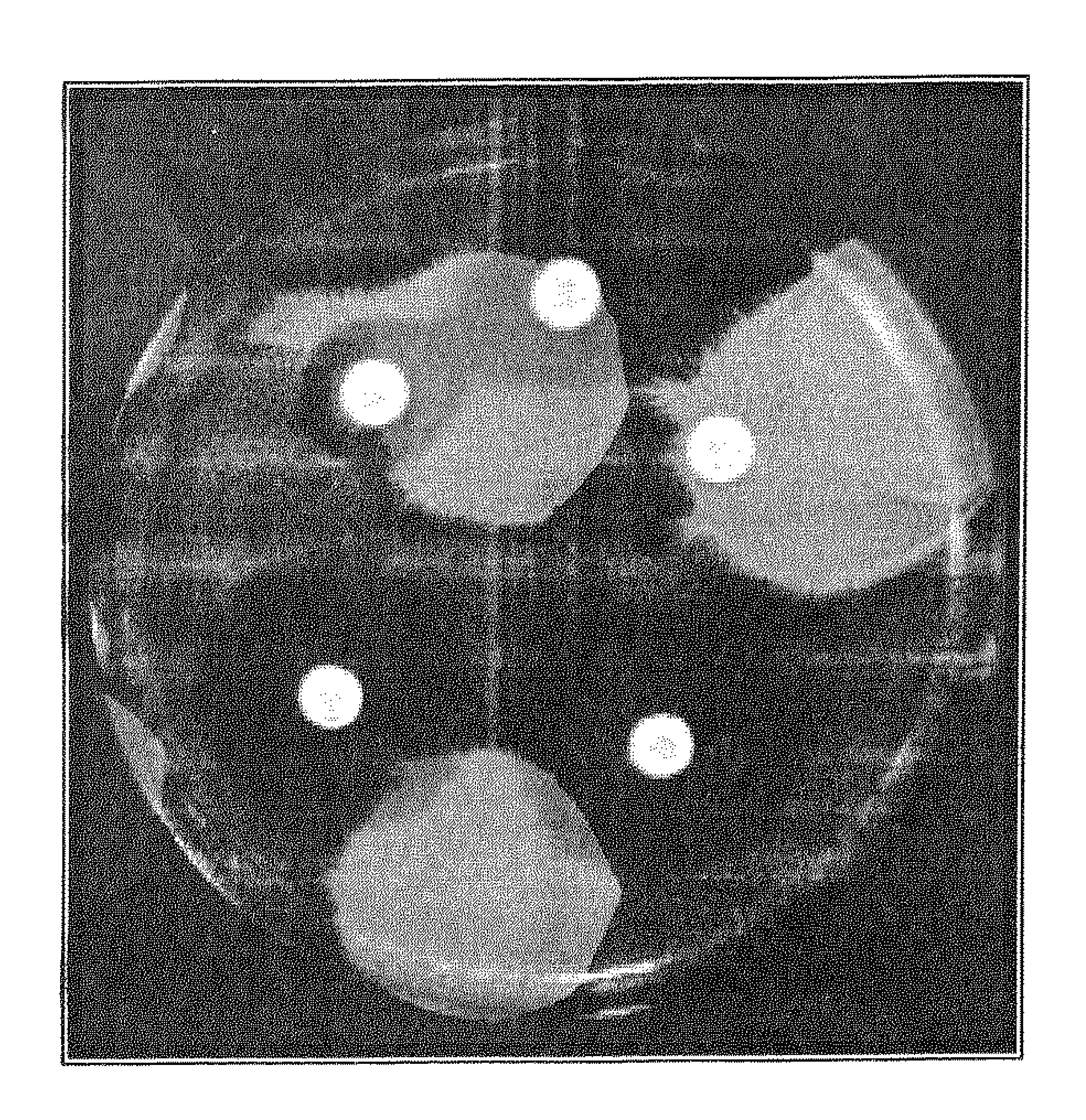
3. أن لا تكون قادرة على انتخاب سلالات مقاومة .

اسم التجربة :

اختبار حساسية البكتريا لمضادات الحياة **Bacterial Suscepitibility to Antibiotics**

طريقة العمل:

1. تحضر أطباق بتري تحتوي على وسط الاكار المغذي او اكار مولر هنتون Mueller Hinton agar
2. يحضر معلق للمزرعة البكتيرية النقية حديثة العمر بواسطة ابرة التلقيح المعقمة يؤخذ مقدار من المزرعة ويوضع في انبوبة تحتوي على 5 مل ماء معقم للحصول تركيز مكافئ لمقياس 0.5 McFarland (10^8 CFU/ml) وترج الانبوبة.
3. يلقح سطح الطبق من المعلق البكتيري بواسطة Cotton swab
4. توضع أقراص المضادات الحيوية على أبعاد متساوية على سطح الطبق الملقح بالمزرعة البكتيرية بواسطة ملقط معقم بالتلهيب الكحولي
5. تحضن الأطباق مقلوبة عند 37م لمدة 24 ساعة
6. يتم البحث عن مناطق التثبيط Inhibition Zones حول الأقراص ثم يقاس قطرها بالمسطرة لتعيين المضاد الأكثر فاعلية ضد البكتيريا المستخدمةانعدام فعالية المضاد على البكتيريا يعني ان البكتيريا مقاومة (غير حساسة) للمضاد Resistantوتكون البكتيريا حساسة Sensitive في حال تأثرها بالمضاد.**شكل(54)**



شكل(54) يبين انواع مختلفة من اقراص المضادات على وسط مزروع بالبكتيريا يظهر مقاومة بعضها(غير حساسة) للمضاد Resistant و حساسية البعض الاخرSensitive

ثامن عشر :استخدام التقنيات الحديثة في التشخيص

اولا: استخدام تقنية Vitek

التشخيص بنظام Vitek 2

يعد فحص Vitek2 من الفحوصات الحديثة والسريعة والدقيقة لتشخيص الأنواع الجرثومية.

هناك عدة خطوات اساسية يجب اتباعها في التشخيص المختبري بنظام Vitek 2 :

1. زراعة المستعمرات المعزولة النقية للبكتريا المراد تشخيصها على وسط اكار الدم.
2. وحضنت لمدة (24) ساعة وفي درجة حرارة (37) مْ وفي جو (5-10 ٪) ثنائي اوكسيد الكاربون .
3. عمل معلقاً للبكتريا في محلول الملح الفسلجي وضبطت كثافة المعلق لمستوى 0,63- 0.5
4. وتوضع العدة التشخيصية في الانبوبة وتدخل في الجهاز لقراءة المعلومات وحفظها .
5. وبعد الانتهاء من ذلك تم اخراج المعلق من الجهاز وقرئت النتائج في اليوم الثاني وحسب تعليمات الشركة المنتجة.

الاختبارات المهمة في التشخيص البكتريا بنظام Vitek 2 :

- **Citrate (CIT)**: إستخدام السترات من الكائن المجهري كمصدر للكاربون وأملاح الامونيوم اللاعضوية كمصدر للنتروجين .

- **Lipase(LIP):** وهوإنزيم محلل للدهون (Svendsen، 2000). وتفرزه العديد من الأحياء المجهرية منها *Candida albicans* ويعد عامل ضراوة للجراثيم (Hube وجماعته،2000).

- **Urease (URE)**: يستخدم هذا الفحص لتحديد قدرة الكائن المجهري لإنتاج إنزيم اليوريز الذي يحول اليوريا الى أمونيا CO_2.

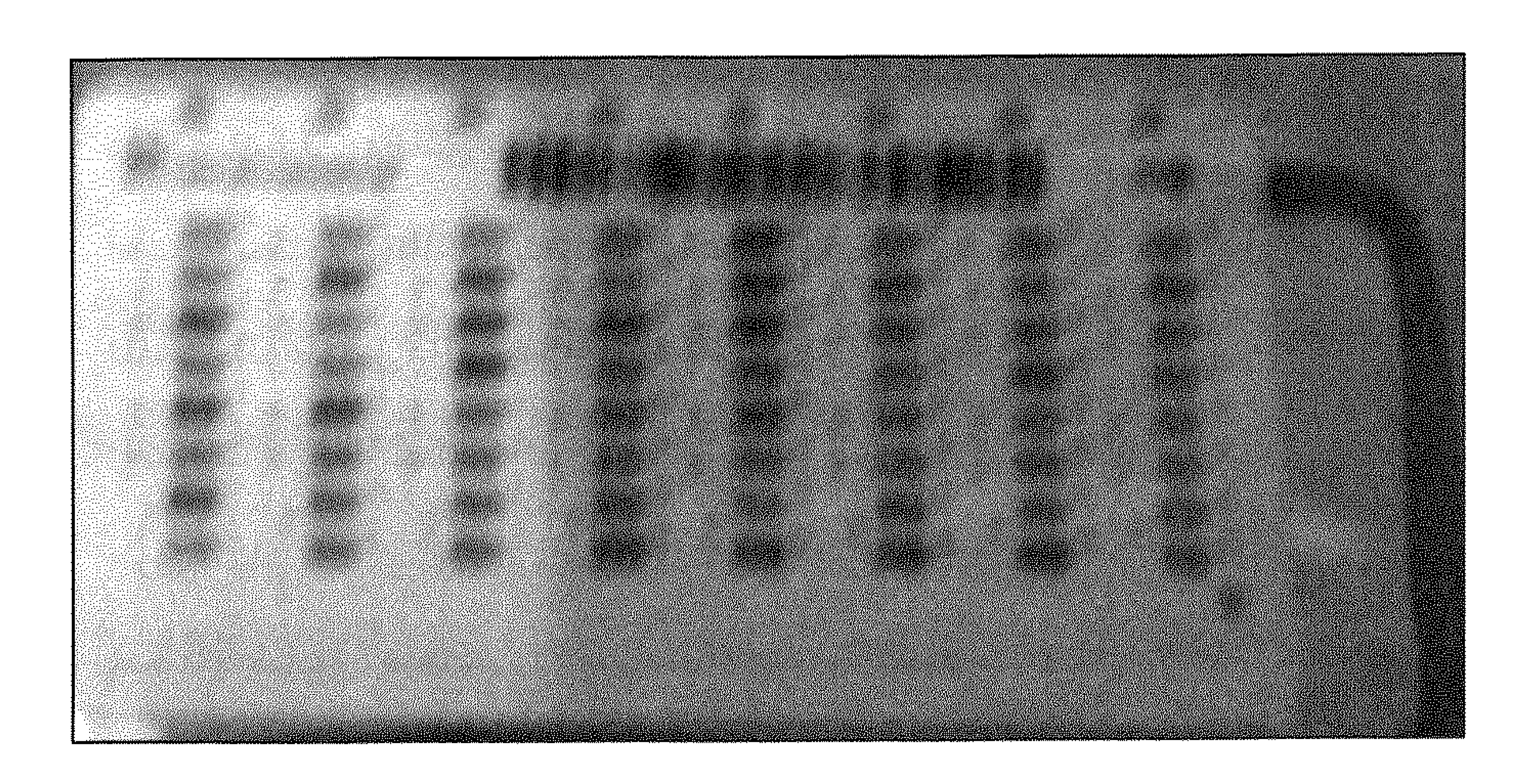
- **Phosphatase (Phos)***: إنزيم محلل للفوسفات إذ يحول حامض الفسفوريك إلى أيون الفوسفات .

- **L-Pyrroglutamylamide peptidasea** (LPYR) يعمل هذا الانزيم على تحليل مادة Oyrrolidomyl-B-napholamide لإنتاج B-napholamide ومن أنواع البكتريا الموجبة لهذا الفحص *Staphylococcus aureus* .

- أنزيمات **Decarboxylase** يستخدم هذا الفحص لتحديد القدرة الإنزيمية للجراثيم لتحليل الاحماض الامينية الى أمينات ومنها:

  - **Orthonine Decarboxylase (ODC)**: يعمل الانزيم على تحليل الحامض الاميني Orthonine،ومن أنواع البكتريا المنتجة لهذا الانزيم *Enterococcus cloae*.

  - **Lysine Decarboxylase (LDC)**: يعمل الانزيم على تحليل الحامض الاميني Lysine ومن أنواع البكتريا المنتجة لهذا الانزيم *Klebsiella pneumoniae*. **شكل (55).**



شكل(55) العدة التعريفية Vitek2 للتشخيص البكتيري.

ثانيا :استخدام الطرق المصلية بالتشخيص

تحضير مستضدات بكتريا السالبة لصبغة كرام :

A- تحضيرالمستضد الجسمي Preparation Somatic antigen:

1. زرعت بكتريا *S.typhi* في الوسط الزرعي السائل مرق نقيع القلب والمخ (BHIB) وحضنت لمدة 48 ساعة بدرجة 37°م.
2. لقحت أوساط زرعية صلبة من آكار الماكونكي وآكار السالمونيلا- الشيكلا بالمزروع المحضر في الخطوة أعلاه بنشره على سطح الوسط الزرعي للحصول على نمو بكتيري كثيف ، حضنت الأطباق بدرجة 37°م لمدة 24 ساعة .
3. جمعت المستعمرات البكتيرية من سطوح أطباق الزرع بغسلها بالمحلول دارئ الفوسفات الملحي (PBS) وجمع السائل وما يحتويه من الخلايا البكتيرية في أنابيب معقمة .
4. وضع العالق البكتيري في دوارق زجاجية معقمة وحضنت في حمام مائي مغلي لمدة ساعتين ونصف .

5. جمعت البكتريا بترسيبها بجهاز النبذ المركزي المبرد بسرعة 3000 دورة/ دقيقة لمدة 5 دقائق .
6. أهمل الطافي (Supernatant) وأعيد تعليق البكتريا في 50 مل من المحلول الملحي الوظيفي بالفورمالين 0.3٪.
7. اختبرت درجة تعقيم العالق البكتيري من خلال تلقيح أنابيب حاوية على مرق الثايوكلايكول أو على وسط آكار السالمونيلا- الشيكلا بدرجة 37°م لمدة 48 ساعة ، فحصت الأوساط لملاحظة النمو .
8. وزع العالق البكتيري في قناني لقاحات معقمة وحفظت في درجة 4°م .

B- تحضير المستضد السوطي Preparation Flagellar antigen:

1. لقح 1 مل من العالق البكتيري في قناني زرع حاوية على 100 مل من مرق نقيع القلب والمخ (BHIB) وحضنت هذه القناني بدرجة 37°م لمدة 48 ساعة .
2. أضيف لهذه القناني حجم مساوي من المحلول الملحي الوظيفي بالفورمالين 0.6٪ وتركت بدرجة حرارة الغرفة لمدة يومين .
3. اختبرت درجة تعقيم العالق البكتيري وذلك بزرع قطرات منه في أنابيب حاوية على مرق الثايوكلايكول أو على وسط آكار السالمونيلا- الشيكلا بدرجة 37 °م لمدة 48 ساعة.
4. جمعت البكتريا من خلال ترسيبها بجهاز النبذ المركزي المبرد بدرجة 5 °م وبسرعة 3000 دورة/ دقيقة .
5. أهمل الطافي وأعيد تعليق البكتريا في 100 مل من المحلول الملحي الوظيفي بالفورمالين 0.3٪ .
6. حفظ العالق البكتيري في قناني لقاحات معقمة بدرجة 4°م .

اختيار النوع الجرثومي :

اختيرت المكورات السبحية التابعة للمجموعة A التي تتضمن *Strep. pyogenes* لافرازها ستربتولايسين -O الذي يعطي تحللا كاملا للدم اذ استخلص المستضد الكاربوهيدراتي من هذه الجرثومة بطريقة فولر وكالاتي :

1) لقحت جرثومة *Strep. pyogenes* بعد التاكد من تشخيصها في دورق يحوي (200 $سم^3$) من المرق المغذي الاعتيادي الحاوي على سكر الكلوكوز بنسبة (1٪) ، وحضنت في درجة حرارة (37) مْ لمدة (24) ساعة .

2) نقل (5) $سم^3$ من المزرعة اعلاه الى انبوبة طرد مركزي معقم ورسبت الخلايا عند 3000 دورة / دقيقة لمدة (20) دقيقة اخذ الراسب وتم التخلص من الراشح بطريقة معقمة .

3) اضيف (0.1) من محلول الفورمامايد الى الراسب ، ومزج ، ثم وضع الانبوب في حمام زيتي في درجة حرارة (160) مْ لمدة (15) دقيقة او اكثر حتى اختفاء العكارة وذوبان الراسب لفصل الكاربوهيدرات عن البروتين .

4) ترك المزيج ليبرد ، ثم اضيف (0.25) $سم^3$ من محلول الحامض الكحولي الذي حُضّر من (5) $سم^3$ حامض الهيدروكلوريك ذي عيارية (1) مولار في (95) $سم^3$ كحول اثيلي نقي Absolute Ethyl Alcohol .

5) رسب المزيج في جهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة / دقيقة لمدة (10) دقائق .

6) اخذ الراشح واضيف اليه (0.5) $سم^3$ من الاسيتون للحصول على عكارة ، ورج ورسب في جهاز الطرد المركزي .

7) بعد التخلص من الراشح ذُوِّبَ الراسب في (0.3- 0.4) سم^3 من المحلول الفسلجي المعقم الحاوي (0.85٪) ملح طعام ، ثم اضيفت قطرات من محلول هيدروكسيد الصوديوم عيارية 0.5 مول / لتر لمعادلة الدالة الحامضية عند pH = 9.0 .

فحص مضاد الستربتولايسين – O Anti Streptolysin –O (ASO)

يعتمد مبدأ الفحص على تفاعل الاجسام المضادة المتولدة في مصل المريض مع المستضد Streptolysin- O الذي يغطي حبيبات اللاتكس في كاشف اللاتكس Latex Reagent الخاص بالفحص.

استخدم فحص الـ ASO لتحديد معيار الاضداد التي تولدها GAS عند التهاب اللوزتين ويعتبر هذا الفحص ايضا من الفحوصات المصلية التي تستخدم في تشخيص التهاب الكبيبات الكلوية السبحية المتأخرة تفرز المكورات السبحية التابعة لمجموعة لانسفيلد A العديد من الذيفانات الخارجية والمحللات للدم ، منها ستربتولايسين -O والذي يكون حساسا للاوكسجين ، ويحلل الدم تحللا كاملا عند نمو مستعمراته على وسط اكار الدم بالاضافة الى انه يمتلك صفة مستضدية والاجسام المضادة له Anti Streptolysin –O تنشأ بعد فترة زمنية وعند تكرار الاصابة.

المحاليل المستخدمة في التشخيص المرفقه مع عدة العمل (Kit) تتمثل ب :

1) معلق حبيبات اللاتكس الكاشفة Latex Reagent

عبارة عن معلق من الحبيبات التي تكون مصنوعة من مادة بولي ستيرين (Polystyren) ومغطاة بالمستضد Streptolysin - O في محلول دارئ يحتوي على ازايد الصوديوم التي تعتبر مادة حافظة .

2) **كاشف السيطرة الموجب : Positive Control**

مصل ارنب يحتوي على اضداد متخصصة من نوع IgG ويحتوي ايضا على المادة الحافظة ازايد الصوديوم بتركيز (0.1٪) .

3) **كاشف السيطرة السالب : Negative Control**

مصل بشري مخفف خال من الاضداد ولكنه يحتوي على ازايد الصوديوم كمادة حافظة بتركيز (0.1٪) .

طريقة العمل :

1) وضع (0.05) سم^3 من المصل المُحَضَّر على شريحة زجاجية نظيفة ومعقمة.
2) وضع بجانبه حجم مماثل من كاشف اللاتكس بوساطة الماصة الدقيقة (Micropipette) .
3) تمزج القطرتان معا بوساطة عود خشبي معقم لكي يتجانس المزيج .
4) يتم فرش المزيج على الشريحة ، ثم حركت الشريحة بعدها بحركة دائرية خفيفة لمدة دقيقتين .
5) تقرأ النتائج اما بالعين المجردة او باستخدام المجهر تحت قوة (10X) .

النتيجة الموجبة حدوث تلازن اما النتيجة السالبة هو عدم حدوث تلازن .

ولمعرفة معيار الاضداد اجريت ستة تخافيف للمصل الموجب باستخدام المحلول الفسلجي وكما هو موضح في **الجدول (6)** .

الجدول (6) تحديد معيار الاضداد لفحص مضاد الستربتولايسين – O

الشريحة	1	2	3	4	5	6
محلول الملح الفسلجي(سم^3)		0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
المصل (سم^3)	0.05					
مزج ونقل	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
التخفيف	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
معيار الاضداد وحدة دولية / سم^3	200	400	800	1600	3200	6400

اضيف (0.05) سم^3 من كاشف اللاتكس الى كل تخفيف ، ومزج جيدا مع التحريك المستمر لمدة دقيقتين ، ولوحظ وجود او عدم وجود تلازن . وبصورة عامة ان القيمة الطبيعية (Normal Value) لفحص ASO هي اقل من 200 وحدة دولية / سم^3 .

تحضير المستضد الكاربوهيدراتي محليا لاختبار الـ ASO :

صنفت المكورات السبحية الحالة للدم الى مجاميع عديدة اعتمادا على اختلاف الصفة المستضدية للكاربوهيدرات المتواجدة في جدار الخلية الجرثومية أي الى مجاميع لانسفيلد وذلك باستخلاص مستضد الجدار الجرثومي ومفاعلته مع المصل المضاد له . وتتواجد طريقتان لاستخلاص مستضد لانسفيلد الكاربوهيدراتي وهي :

1) استخدام حامض الهيدروكلوريك التي اكتشفتها لانسفيلد سنة 1933 .

2) استخدام محلول الفورمامايد والتي اكتشفها فولر سنة 1938 .

تاسع عشر: استخدام الطرق الجزيئية بالتشخيص.

استخلاص DNA من البكتيريا السالبه لصبغة غرام .

استخلص DNA من البكتريا المعزوله اذ التقطت المستعمرات البكتيريه المفرده من طبق وسط الزرعي بعد التاكد من كونها تمثل البكتريا المراد عزلها باستخدام الطرائق المظهريه- الكيموحيويه، وعلقت في المرق المغذي ثم حضنت بدرجة حراره 37م لمدة 24 ساعه، بعدها استخلص ال DNA من البكتيريا يحصل استخلاص الحامض النووي بطرق متعددة فقد يتم الاعتماد على الطريقة اليدوية باعتماد تحضير المحاليل المطلوبة مثل طريقة الفينول –كلوروفورم او باعتماد العدد الجاهزة للاستخلاص والتي تختلف خطواتها جزئيا باختلاف الشركات ومنها Promega, Genaid, Invitrogen او غيرها ويرفق مع كل عدة طريقة العمل المرفقه مع عدة استخلاص DNA تحدد خطوات العمل كما يلي .

1) نقل الخلايا البكتيريه المزروعه في المرق المغذي الى انبوبه ابندروف سعة (1.5) مل.
2) تجري عملية الطرد المركزي لعالق البكتيريا لمدة دقيقه واحده على قوة(14.000-16.000 xg) و تم التخلص من الرائق ويبقى الراسب.
3) تضاف (200ul) من (GT buffer) الى الراسب وتخلط جيدا بواسطة الماصه الالكتروني او بواسطة جهاز vortex، ويحضن بدرجة حرارة الغرفة لمدة (5)دقائق.
4) تضاف (200ul) من (GB buffer) الى العينه وتخلط جيدا بواسطة الماصه الالكتروني او بواسطة جهاز vortex لمدة (5)ثوانٍ .
5) توضع العينه في الحمام المائي على 70م لمدة 10دقائق واثناء هذه المدة يجب تحريك و مزج العينه كل3 دقائق وخلال هذه الخطوه نضع 200ul من

Elution buffer لكل عينه من العينات قيد الدراسه في الحمام المائي (70م)
لاستخدامه في الخطوات التاليه.

6) لغرض التخلص منRNA نضيف 5 مايكروليتر منRNAase لكل عينه ثم تخلط جيدا بواسطة vortex، وتحضن بدرجة حرارة الغرفة لمدة (5)دقائق.

7) يضاف 200مايكروليتر من الايثانول المطلق الى العينه وتخلط فوراً بواسطة vortex واذا ظهرت رواسب يجب تكسيرها بواسطة الماصه.

8) وضع GD column في انبوب جمع collaction tube سعة 2 مل ثم توضع العينه فيه ويجرى الطرد المركزي لمدة 2 دقيقه وعلى قوة 14.000-16.000 xg

9) يستبعد انبوب الجمع الحاوي على السائل المترشح ويوضع GD column في انبوب جمع جديد.

10) يضاف 400 مايكروليتر منW1 buffer الى GDcolumn يجرى طرد مركزي لمدة 30 ثانيه على قوة (14.000-16.000 xg).

11) يطرح السائل المترشح في انبوب الجمع ويرجع GD column الى انبوب الجمع نفسه ويضاف له 600 مايكروليتر من wash buffer ثم يجرى الطرد المركزي لمدة 30 ثانيه وعلى قوة (14.000-16.000 xg).

12) يطرح السائل المترشح ويوضع GDcolumn مره اخرى في انبوب الجمع، ولغرض تجفيف العينه بشكل جيد نجري الطرد المركزي لمدة 3 دقائق على قوة ثم يوضع GDcolumn المجفف في انبوبة اختبار سعة 1.5 مل، ويضاف 100ul من Elution buffer المسخن مسبقا الى الخليط ويترك لمدة 3- 5 دقائق بعدها يجرى الطرد المركزي لمدة 30 ثانيه على قوة (-14.000 16.000 xg)في هذه الخطوه سوف نحصل على DNA بشكل نقي.

13) يحفظ DNA في درجة حراره 20- م لحين الاستعمال.

14) قيسَ تركيز DNA في 50 عينة DNA مستخلصه من العزلات البكتيريه بواسطة جهاز يعرف المطياف الضوئي الدقيق(optizen pop) لقياس كمية ال DNA والذي يعتمد على مبدأ قياس الطول الموجي لعينة DNA.

بعد استخلاص ال DNA تجرى الخطوة اللاحقة وهي تفاعل البلمرة لمضاعفة الحامض النووي والكشف عن الجينات الخاصة بكل كائن

تفاعل البلمرة التتابعي Polymerase chain reaction (PCR)

يجرى هذا التفاعل بطرق متعددة الطريقه المفرده والمتعدده single and multiplexPCR او باستخدام الانزيمات القاطعة للكشف عن الجينات التشخيصية او للكشف عن تحديد عوامل الضراوه ويتم ذلك باستخدام بوادىء خاصة بهذه الجينات اذ تخلط كميات محددة منها مع ال DNAالمستخلص مع خليط المزج الحاوي على نيوكليوتيدات والتي تسمى green master mix بعدها يحدد برنامج التفاعل لجهاز ال PCR thermocycler وبعد الانتهاء تستخرج الانابيب لتجرى عليها عملية الترحيل الكهربائي .

الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز Agarose Gel Electrophoresis

1) حضر هلام الاكاروز باذابة 1g من مادة الاكاروز في 100 مل منTBE buffer المخفف مسبقا بتركيز10%.

2) يسخن المحلول مع الرج المستمر الى ان تظهر الفقاعات ، توقف عملية التسخين ، ويبرد المحلول الى 50 م ، ثم نضيف 1مايكروليتر من صبغة الاثيديوم بروميد ويرج المحلول حتى يتجانس ، ثم يصب المحلول في الصفيحه الخاصه بجهاز الترحيل الكهربائي(tray)بعد تثبيت المشط comb الملائم لعدد العينات ويترك ليتصلب لمدة 30دقيقه.

3) يرفع المشط ويوضع الاكاروز المتصلب في جهاز الترحيل الكهربائي ثم يغمر الاكاروز بمادة TBE buffer بمقدار 2cm تقريبا.

4) يخلط 5ul مايكروليتر من ladder مع 1ul من loading dye ويضاف الى الحفره الاولى.كما يضاف 10مايكروليتر من كل عينة DNA في الحفر اللاحقه مع الانتباه الى تعليم الحفر.

5) يبدأ جهاز الترحيل الكهربائي بترحيل عيناتDNA على 70V ولمدة 60 دقيقه.

6) استعمل جهاز (uv transilluminater) لمشاهدة حزم DNA التي تظهر بلون برتقالي بسبب صبغة الاثيديوم بروما يد المشعة، وصور الهلام باستعمال كاميرا (digital gamera) .



شكل (56) جهاز PCR للتشخيص الجزيئي لعينات الاحماض النووية.

تفاعل البلمرة المتسلسل بالوقت الحقيقي Real Time – PCR))

تستخدمت لهذا الغرض عدة الفحص والمتكونة من ثلاثة أجزاء:-

الجزء الأول :

(Sorb – Ribo)لعزل الحامض النووي لفيروسي الرنا (RNA) من النماذج السريرية والذي يتكون من الآتي :-

- محلول التحلل Solution Lysis)) وبكمية مقدارها (22.5) مللتر.
- محلول الغسل (Washing Solution) وبكمية مقدارها (20) مللتر.
- المُمتز (Sorbent) وبكمية مقدارها (1.25 (مللتر.
- دارئ انتزاع الحامض النووي الرنا (RNA eluent) لتحرير ارتباطه من المرشح داخل العمود وبكمية مقدارها (5×1.2 (مللتر.

الجزء الثاني:-

Real-TM Astrovirus Norovirus Rotavirus والمتكونة من

- خليط Astrovirus PCR-mix-1 Rotavirus)) وبكمية مقدارها (0.6) مللتر.
- خليط (Norovirus □ IC PCR-mix-1) وبكمية مقدارها (0.6(مللتر.
- خليط الاستنساخ المعكوس (RT-PCR-mix-2) وبكمية مقدارها (0.6) مللتر.
- إنزيم البلمرة المقاوم للحرارة (Polymerase Taq Hot Start) وبكمية مقدارها (0.06) مللتر.
- إنزيم التفاعل المعكوس (Revertase M-MLV) وبكمية مقدارها (0.03(مللتر.

- خليط الاستنساخ المعكوس (2) الثاني (RT- G- mix - 2) وبكمية مقدارها (0.03) مللتر.

الجزء الثالث:

يحتوي على عوامل السيطرة (Controls) والمؤلفة من:-

- السيطرة الداخلية للرنا (IC RNA) وبكمية مقدارها (5×0.12 (مللتر.
- السيطرة السالبة (Negative Control C-) وبكمية مقدارها (1.6) مللتر.
- السيطرة الموجبة للدنا المتممة (Astrovirus Rotavirus □ cDNA Pos C+) وبكمية مقدارها (0.1 (مللتر.
- السيطرة الموجبة للدنا المتممة (Norovirus cDNA Pos IC C2 □ +) وبكمية مقدارها (0.1) مللتر.
- دارئ الحامض النووي الدنا (DNA - buffer) وبكمية مقدارها (0.5) مللتر.

عدة تفاعل البلمرة المتسلسل المعكوس ((RT-PCRللتحري عن الحامض النووي(الرنا) في العينة :

تتكون عدة الفحص من :

1) البوادئ primers

2) عدة استخلاص الحامض النووي الرنا (RNA)

3) عدة الاستنساخ العكسي للرنا أحادي الخطوة لـ RNA(ONE-STEP RT-PCR Premix Kit)

4) عدة master mix (PreMix PCR ®*AccuPower*)

5) عدة الترحيل الكهربائي

6) عدة استخلاص الحامض النووي (الرنا)

استخدمت عدة استخلاص الحامض النووي (™IQeasy plus Viral (RNA Extraction kit/DNA

7) عدة الاستنساخ العكسي لـ (RNA) وتحويله للدنا المتمم cDNA))

استخدمت عدة تحويل الرنا ((RNA المصنعة في شركة (INtRON Biotechnology) الأميركية والمحتوية على المكونات الاتية في كل أنبوبة :

OptiScript ™RT System
RT- PCR buffer (10x)
DNTPs
i-StarTaq™ DNA polymerase
Stabilizing buffer

8) عدة ال(AccuPower® PCR PreMix)

استخدمت العدة المتكونة من (96) أنبوبة وكل أنبوبة محتوية على :-

DNA polymerase	1 U Taq
Each: dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	250 mM
Tris-HCl (pH 9.0)	10 mM
KCl	30 mM
MgCl2	1.5 mM
Stabilizer and tracking dye	

9) عدة الترحيل الكهربائي(Electrophoresis)

تم استخدام العديد من المكونات ومن شركات مختلفة وعلى النحو الآتي:-

جدول :عدة الترحيل الكهربائي.

أكاروز Agarose	Bioneer
بروميد الاثيديوم Ethidium bromide	Bioneer
الواسم (المُعلم) وصُبغة التحميل 100 bp DNA ladder and loading dye)	Promega
دارئ ترس البوريت TBE buffer	Bioneer

الكشف عن الاحياء المجهرية باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل بالوقت الحقيقي (Real Time – PCR)

اساس عمل الاختبار

يعتمد اختبار المعايرة للكشف عن الجراثيم ، النورو والاسترو بطريقة الوقت الحقيقي لتفاعل البلمرة المتسلسل.

على ثلاث عمليات رئيسة وهي :-

1 استخلاص الحمض النووي (الرنا) الفيروسي RNA (viral) من النماذج والعينات المراد العزل منها ومنها العينات السريرية .

2 الاستنساخ العكسي للرنا الفيروسي لمرحلة واحدة و تضخيم الدنا الفيروسي المتمم (cDNA) بطريقة الوقت الحقيقي لتفاعل البلمرة المتسلسل ..

تعتمد عملية التشخيص على تضخيم موقع خاص من مورث العامل المرضي باستخدام بوادئ خاصة بعدها يتم الكشف عن المصبغات الومضانية (fluorescent dyes) ، ان هذه الصبغات تكون مرتبطة مع المجسات المؤلفة من النيوكليوتيدات والتي ترتبط بشكل متخصص مع ناتج التضخيم .

ان تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل بالوقت الحقيقي هي عبارة عن فحص كمي ، إذ تحتوي عدة الفحص على السيطرة الداخلية (IC) والتي يجب ان

تستخدم في عملية استخلاص الحامض النووي الفيروسي وذلك لغرض السيطرة على عملية الاستخلاص لكل نموذج مفرد وكذلك بغية التعرف على أي مثبط للتفاعل .

استخلاص الحامض النووي الرنا (RNA)

- يحُضر (10 ٪) من عالق البراز مثلا اواي عينة اخرى بإضافة (4.5). مللتر من المحلول الملحي (Saline solution) إلى (0.5) غرام أو (0.5) مللتر من الخروج في انبوبة سعة (5) مللتر.
- يخلط المزيج آنفا باستخدام جهاز الرج الكهربائي (vortex) لغرض الحصول على عالق متجانس وطرد المزيج بجهاز النبذ (الطرد) المركزي لمدة (5) دقائق وبسرعة مقدارها (7000g- 12000g) ، بعدها استخدم الجزء الطافي المحتوي على الفيروس في عملية استخلاص الحامض النووي واُهمل الراسب.
- يحضير عدد من أنابيب اپندورف مع ترك واحدة من هذه الأنابيب كسيطرة سالبة للاستخلاص(Negative control Extraction).
- يضاف (450) مايكروليتر من محلول التحلل و(10) مايكروليتر من السيطرة الداخلية (IC RNA) .
- يضاف (100) مايكروليتر من الجزء الطافي المحتوي على الفيروس الى الانابيب المحتوية على محلول التحلل والسيطرة الداخلية ، مُزج الخليط بالماصة الالكترونية وحُضن لمدة (5) دقائق بدرجة حرارة الغرفة .
- يضاف (50) مايكروليتر من السيطرة السالبة الى الانبوبة المتروكة للسيطرة السالبة .
- ترج الانابيب وطردت بجهاز الطرد الكهربائي لمدة (5) ثوان وبسرعة (5000g) .

- يرج المُمتز (Sorbent) بشدة وأضيف منه (25) مايكروليتر لكل أنبوبة ، بعدها رُجت لمدة (5- 7) ثوان وحُضنت جميع الانابيب لمدة (10) دقائق بدرجة حرارة الغرفة .
- طُردت الانابيب لمدة (1) دقيقة وبسرعة (10000g) وباستعمال الماصة الدقيقة يسحب الجزء الطافي من الانابيب بعناية تامة ويُسكب مع ملاحظة عدم المساس بالجزء الراسب المتكون .
- أُضيف (400) مايكروليتر من محلول الغسل (Washing solution) لكل انبوبة ، رُجت الانابيب بشدة وطُردت لمدة دقيقة واحدة بسرعة (10000g) وباستعمال الماصة الدقيقة يسحب الجزء الطافي من الانابيب بعناية تامة ويُسكب مع ملاحظة عدم المساس بالجزء الراسب المتكون .
- وُضع (500) مايكروليتر من الكحول الاثيلي بتركيز (70٪) لكل انبوبة ، رُجت الانابيب بشدة وطُردت لمدة دقيقة واحدة بسرعة (10000g) وباستعمال الماصة الدقيقة يسحب الجزء الطافي من الانابيب بعناية تامة ويُسكب مع ملاحظة عدم المساس بالجزء الراسب المتكون .
- أُعيدت الخطوة السابقة .
- أُضيف (400) مايكروليتر من الاسيتون لكل انبوبة ، رُجت الانابيب بشدة وطُردت لمدة دقيقة واحدة بسرعة (10000g) وباستعمال الماصة الدقيقة يسحب الجزء الطافي من الانابيب بعناية تامة ويُسكب مع ملاحظة عدم المساس بالجزء الراسب المتكون .
- حُضنت الانابيب بدون اغطية لمدة (10) دقائق بدرجة (60) م° .
- أُعيد تعليق راسب كل الأنابيب بإضافة (50) مايكروليتر لكل انبوبة من دارئ انتزاع الرنا (RNA – eluent) ، حُضنت الانابيب لمدة (10) دقائق

بدرجة (60) م° ، هُزت الأنابيب بشكل مستمر وطُردت مركزيا بالجهاز لمدة دقيقتين بسرعة قصوى مقدارها (12000 g - 16000 g) .

- اصبح العالق محتوياً على الرنا الفيروسي الجاهز للاستخدام في تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل بالوقت الحقيقي (Real Time – PCR) والذي تم استخدامه في اليوم نفسه .

الاستنساخ العكسي للرنا (RNA) وتضخيم الدنا المتمم (cDNA)

يكون الحجم الكلي للتفاعل هو (25) مايكروليتر ، أما حجم الرنا (RNA) فهو (10) مايكروليتر .

تتضمن عملية الاستنساخ المعكوس والتضخيم الخطوات الآتية : -

- حُضرت الكمية المطلوبة من انابيب التفاعل (عادة انبوبتين لكل نموذج + انابيب سيطرة).
- تم تحضير مزيج التفاعل الكافي لكل الانابيب المطلوبة (بحسب العدد) ، و لتحضير خليط يكفي لخمس عينات تخلط المواد الآتية في انبوبة واحدة .

10(5+1) مايكروليتر من مادة RT- PCR - mix - 1 (Rotavirus □ Norovirus □ IC or Astrovirus) .

5 (5+1) مايكروليتر من مادة RT - PCR – mix – 2

0.5) 5+1) مايكروليتر من إنزيم البلمرة polymerase

0.25 (5+1) مايكروليتر من مادة RT- G - mix - 2

0.25 (5+1) مايكروليتر من مادة MMIv

تُرج الانبوبة لمزج المحتويات ثم تُطرد مركزياً لفترة قصيرة

- أُضيف (15) مايكروليتر من مزيج التفاعل اعلاه لكل أنبوبة من الأنابيب الخاصة بالنماذج والسيطرات التي تم تعليمها مسبقاً (مثلاً نموذج (1) ، نموذج (2) ، سيطرة سالبة ، سيطرة موجبة ، ... الخ) .
- وباستخدام تپات مع مرشحات لمنع مرور الرذاذ أضيف (10) مايكروليتر من الرنا المستخلص سابقاً الى الانابيب الخاصة بالنماذج (تپ واحد لكل نموذج) وتُخلط المحتويات بعناية بالماصة الالكترونية .
- حُضر لكل مصفوفة من الأنابيب (النماذج) ثلاث سيطرات وعلى النحو الآتي :-
- أُضيف (10) مايكروليتر من دارئ الدنا (DNA - uffer) إلى الأنبوبة المكتوب عليها السيطرة السالبة للتضخيم Amplification Negative ((control .
- أُضيف (10) مايكروليتر من الدنا المتمم الموجب cDNA Pos)) إلى الأنبوبة الحاوية على خليط (□ Astrovirus PCR-mix-1 Rotavirus).
- أُضيف (10) مايكروليتر من الدنا المتمم الموجب (cDNA Pos) لفيروس النورو والسيطرة الداخلية الى الانبوبة الحاوية على (PCR- mix- Norovirus IC) .
- تمت برمجة جهاز الـ RT (PCR–) على النحو الآتي :- **جدول(9)**

جدول(9) برمجة جهاز الـ RT (PCR.

عدد الدورات		درجة الحرارة	الزمن اللازم
دورة واحدة	-	50 م°	30 دقيقة
دورة واحدة	-	95 م°	15 دقيقة
45 دورة	-	95 م°	10 ثانية
	FAM , JOE ǀ HEX ǀ Cy3	60 م°	30 ثانية
	-	72 م°	10 ثانية

- **تُقرأ النتائج من خلال وجود تقاطع للومضان والذي يظهر على شكل منحنيات للفلورسنت حسب خط التقاطع الحاصل بين المحور السيني والمحور الصادي للمنحني .**
- **تمت قراءة السيطرة الداخلية (IC) على قناة (FAM) ، بينما قُرئت فيروسات النورو على قناة (Cy3) عندما كان الخليط هو (PCR-mix- Norovirus IC) .**
- **قُرئت فيروسات الروتا على قناة (FAM) ، اما فيروسات الاسترو فإنها قُرئت على قناة (Cy3) عندما كان الخليط هو (PCR-mix-1 Rotavirus Astrovirus) .**

أُعتبر النموذج موجب النتيجة عندما كانت قيمة قمة دورة التقاطع (cycle (Ct thresheld تتراوح بين 0 و 33 ، أي ان الـ Ct اقل من 33 (33 > Ct) .

عشرون :الفايروسات

تركيب فيروس Structure

يتكون فيروس من :-

الطبقة الخارجية (السطحية) The outermost layer

الطبقة الوسطية The intermediate layer

الطبقة الداخلية العميقة The innermost layer

تكون الجسيمة الفيروسية معقدة وكبيرة (1000) أنجستروم وباستعمال المجهر الالكتروني أصبح من الممكن مشاهدة ثلاثة أنواع من الجزيئات في سايتوبلازم الخلايا المُخمجة ، النوع الأول هو جزيئة الفيروس ثلاثية الطبقات) [TLP] Triple Layer Particle)] وتمثل جزيئة كاملة مُعدية يبلغ قطرها (100) نانومتر تتميز بوجود محفظة بروتينية منشوريه ثلاثية الطبقات (طبقة خارجية ، وسطى و طبقة لبيه داخلية) ، أما النوع الثاني فهو جزيئة فيروسية ثنائية الطبقات (Double Layer Particle [DLP]) تتكون عندما تفقد الطبقة الخارجية للجزيئة ثلاثية الطبقات بينما يمثل النوع الثالث جزيئة مفردة الطبقة (طبقة لبية داخلية فقط) هذا النوع نادر الوجود ويتميز بفقدانه للمورث وتتجمع هذه الجزيئات في سايتوبلازم الخلايا المصابة مع مثيلاتها.

الأوساط الزرعية المستخدمة لتنمية الفيروس

أ- الوسط الزرعي الخاص لنمو خلايا الزرع النسيجي : والذي يحتوي على المكونات الآتية :-

1. الوسط الزرعي الخام (Minimum Essential Medium) (MEM) لشركة Technologist
2. مصل جنين البقر بنسبة (10٪).

3. محلول بيكربونات الصوديوم لمعادلة الحامضية بتركيز (6.5 ٪) للوصول إلى درجة قياسية للأس الهيدروجيني للوسط الزرعي (6.8 - 7 =PH).
4. محلول المضادات الحيوية بتركيز 100 وحدة دولية من البنسلين البلوري و100 مايكرو غرام من الستربتومايسين / مل من الوسط الزرعي.

ب- **الوسط الزرعي الحافظ** الخاص لتنمية الفيروس (Maintenance Medium) (MEM)

يحتوي على مكونات الوسط الزرعي المذكورة آنفاً في الفقرة (أ) مع إضافة المصل بتركيز (2٪) و اضافة التربسين بتركيز 0.5)) مايكرو غرام / مل من الوسط الزرعي .

خلايا الزرع النسيجي المستخدمة في تنمية الفيروس وعزله

تستخدم لهذا الغرض خلايا الخط الزرعي عديدة ومنها خلايا كلية القردة الأفريقية الخضراء (**Vero –cell line**) التي يحصل عليها من تجاريا من الشركات البايولوجية العلمية .

حقن الفيروس في خلايا الزرع النسيجي

يتم عزل الفايروس من النماذج المرضية باستخدام صندوق الحفظ المبرد (Cool Box) ثم تترك النموذج ليصل الى درجة حرارة الغرفة ثم تتبع الخطوات الاتية: -

- عُومل نموذج الفيروس المحضر من النماذج المرضية بالتربسين بتركيز((10 مايكرو غرام / مل قبل حقنه بالخلايا ووضع في حاضنة ثاني اوكسيد الكاربون (Co2 incubator) لمدة ساعة .
- أُخذ ((2 مل من الفيروس المحضر وحقن على سطح الخلايا الموجودة في دورق الزراعة النسيجية (Tissue culture flask) سعة (25 سم^3) المحتوي على خط خلايا جنين القردة الإفريقية الخضراء (Vero cell – line) أحادية

الطبقة وحُضن الوعاء في حاضنة ثاني اوكسيد الكاربون (CO2 incubator)) مع تحريك السائل الزرعي المستمر كل 10 دقائق لمدة ساعة .

- سُكب الوسط الزرعي الزائد و أضيف (12 - 10) مل من الوسط الزرعي الحافظ (الخاص بالمحافظة على الخلايا الزرعية دون تكاثرها والسماح بتكاثرالفيروس) والحاوي على التربسين بتركيز 0.5 مايكرو غرام / مل ، حُضن الوعاء في حاضنة (CO_2) بدرجة (37م°) وتمت المتابعة اليومية لملاحظة نمو الفيروس عن طريق مشاهدة التأثيرات المرضية للفيروس(CPE) على خلايا الزرع النسيجي وتسجيل النتائج وتصويرها بكاميرا Kodak)) الرقمية.
- بعد انتهاء مدة الحضن جمد الوعاء الحاوي على الخلايا المصابة تحت (-65م°) لمدة يوم كامل ثم أذيبت وكررت عملية التجميد والإذابة ثلاث مرات ثم أُخذ االسائل المحتوي على الفيروس والخلايا ونبذ بجهاز الطرد المركزي بسرعة (3000 دورة / دقيقة) لمدة (15) دقيقة .
- اخذ الجزء الطافي وعومل بالتربسين بطريقة التمريرة الأولى نفسها واستمرت التنمية لعدة تمريرات تصل الى اكثر من عشرة تمريرات .

قياس المعيار الحجمي للفيروس

تم استخدام طريقة المعايرة الدقيقة لمعرفة المعيار الحجمي للفيروس في الزرع النسيجي .

1. حيث استخدمت صفيحة المعايرة الدقيقة Microtiter plate بحفر ذات سطوح مستوية (96 حفرة) .
2. بعدها عُوملت خلايا الزرع النسيجي ((Vero cell – line او غيرها من خلايا الزرع النسيجي الموجودة في الدوارق الزرعية ذات المساحة السطحية 25))

سم2 بخليط التربسين – فيرسين [الحاوي على التربسين بتركيز(0.05٪) والفيرسين (0.025 ٪)] لانتزاع الخلايا من سطح الدورق الزرعي.

3. وبعد إتمام عملية انفصال الخلايا عن السطح بعضها عن بعض بعد معاينتها بالمجهر الضوئي المقلوب سُكب خليط التربسين – فيرسين الزائد و عُلقت الخلايا بإضافة (10) مل من الوسط الزرعي الخاص بنمو الخلايا لإيقاف عمل التربسين وتعليق الخلايا المسلوخة داخل الدورق الزرعي .

4. بعد مجانسة الخلايا وزع عالق الخلايا على حفر الطبق بواقع (0.1) مل من العالق الخلوي لكل حفرة من حفر طبق المعايرة الدقيقة ، وبعد تغطيتها بغطاء معقم .

5. حُضنت الخلايا لمدة ((48 - 24)) ساعة مع المراقبة اليومية بالمجهر المقلوب (Inverted Microscope) لحين اكتمال تكون طبقة أحادية من الخلايا (Complete Mono layer cells).

6. تتم معايرة الفيروس بطريقة عمل تخافيف عشرية متسلسلة للعالق الفيروسي باستخدام محلول دارئ الفوسفات الملحي الحاوي على التربسين بتركيز (10) مايكرو غرام / مل في عشرة أنابيب اختبار معقمة وحُضنت الأنابيب لمدة (30) دقيقة بدرجة (37 م°) لتهيئة الفيروس للحقن في خلايا الزرع النسيجي ((Vero cell – line.

7. سُكب الوسط الزرعي الخاص بالنمو الموجود في حفر طبق المعايرة الدقيقة وغُسلت الخلايا المُنماة في الحفر مرتين متتاليتين بالوسط الزرعي الحافظ.

8. ثم حُقن الفيروس بكمية مقدارها (50) مايكرو ليتر لكل حفرة وبواقع أربع حفر لكل تخفيف وتركت حفرتان للسيطرة مقابل كل تخفيف دون معاملتها بالفيروس إذ تم حقنها بمحلول PBS (PH= 7.2) والحاوي على الكمية نفسها من التربسين .

9. وبعد تغطية الطبق الزرعي بغطاء معقم ، حُضن طبق المعايرة الدقيقة بدرجة حرارة (37 م°) لمدة ساعة لغرض التصاق (Attachment) الفيروس بسطوح الخلايا.
10. وبعد انتهاء مدة الحضن، سُكب العالق الفيروسي الزائد غير الملتصق وأضيف الوسط الزرعي الحافظ الحاوي على التربسين بتركيز (0.5) مايكرو غرام / مل وبمعدل 0.1 مل لكل حفرة.
11. حُضن طبق الخلايا المحقونة من جديد بدرجة حرارة (37 م°) لمدة 72-48)) ساعة .
12. بعدها تم التخلص من الوسط الزرعي الحافظ وغسلت الحفر بدارئ الفوسفات الملحي المعقم (PH=7.2) وثبت النسيج الخلوي بالأسيتون البارد (4 م°) لمدة عشر دقائق وجففت بالهواء لمدة (10) دقائق .
13. بعدها أضيفت قطرة واحدة من كاشف (HRV reagent) [أضداد الفيروس المحضرة في الأرانب] ثم غسلت الحفر بمحلول دارئ الفوسفات الملحي (PH=7.2) .
14. إضافة الأضداد المعلمة بصبغة الفلورسين المضادة للأضداد المحضرة في الحيوان المختبري كضد لفيروس وحضنت لمدة (15) دقيقة بدرجة (37م°) .
15. بعدها غُسلت الحفر في طبق المعايرة الدقيقة بمحلول (PBS / Tween 20) لمدة (15) ثانية لإزالة الزائد من الأضداد .
16. وبعد التجفيف أضيفت الصبغة المضادة Counter stain)) لتكوين أرضية معتمة لغرض معاينة الخلايا لملاحظة الفيروس في الخلايا المصابة في غرفة مظلمة باستخدام مجهر ومضاني .

المصادرالعربية

1. تومبسون، كيمبرلي (2003).المضادات الحياتيىة ،مشاكل وحلول ترجمة مركز التعريب والترجمة . الدار العبية للعلوم . بيروت –لبنان

2. ألمعموري ، عبالنبي جويد : حسين، عروبة كطوف (2015) ألاحياء المجهرية ، اسس ، تركيب وفسلجة . الدار المنهجية للنشر والتوزيع ز عمان –الاردن.

3. باقر، عبدالواحد :علي ، لوزان : ألراوي ، انيس :عبدالغني ، زكي : العاني ، فاروق: ابراهيم ، ممد :الصقر ،الحان و مهدي، هدى (1989) البكتريا . بيت الحكمة للطباعة والنشر – بغداد .

المصادر الاجنبية

1. **Santos,** O.; Weckx, L.L.L.M.;PignatariA.A.C. and Pignatari S.S.N. (2003).Detection of Group A Beta-Hemolytic Streptococcus Employing Three Different ,Braz. J. Infect Dis ,7(5):297-300.

2. **Thomas,** M. D. (2010). Seventh edition ,Text Book of Biochemistry With clinical correlation, Wiley – liss, Drexel University, Inc.Pubilication, USA.

3. **Karam**, G.H. and J. E. Heffer. (2000). Emerging issue in Antibiotic Resistance in Blood - borne Infections. Am. J. Respir. Crit. Care. Med., 162(5):1610-1616.

4. **Jacoby**, G.A. and Munoz-Price, L.S. (2005). The new β-lactamases. N. Engl. J. Med., 352(4): 380-391.

5. **Brooks** G.F.; J.S. Butel and S.A. Morse.(2007). Jawetz. Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. 24th ed, McGraw-Hill.

6. **Collee** J.; A.G. Fraser; B.P. Marmian and S.A. Simmon. (1996). Mackie and McCartney. Practical Medical Microbiology. 14th ed. Churchill and Livingstone, INC.

7. **Koneman**,E.W.;Allen,S.D.Janda,W.M; Schreekenberger,P.C. and Winn,W.C. (1997). Color atlas and textbook of diagnostic microbiology , 5th ed. J. Lippincott company, Philadeliphia. USA.

8. **Levinson,**W.(2004). Medical microbiology and immunology . Examination and board review ,9th ed.. lang medical book. Mc.Grew Hill.

9. **Lewis**,K (2008) Multidrug tolerance of biofilms and persister cellsCurr. Top. Microbiol. Immunol., 322 pp. 107–131.

10. **Holt**, J.G.,Kjrieg,N.R.,Sheath,P.H.,Stalely, J.T.and Williams, S.S.T.(1994). Bergys manual of determinative bacteriology 9th ed. Williams and Wilkins USA.

الأحياء المجهرية التشخيصي

Diagnostic Microbiology





دار صفاء للطباعة والنشر والتوزيع
المملكة الأردنية الهاشمية - عمَّان - شارع الملك حسين
مجمع الفحيص التجاري - هاتف : 4611169 6 962+
تلفاكس: 4612190 6 962+ ص.ب 922762 عمَّان 11192 الأردن
Safa@darsafa.net Safa@darsafa1.net Safa@darsafa.info
دار صفاء للنشر والتوزيع
دار صفاء للنشر





9 789957 249793